

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke  
Gefäßzentrum - Angiologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Ulrich Hoffmann

Akute Hyperhomocysteinämie führt zu makro- und mikrovaskulärer endothelialer  
Dysfunktion, die durch Vorbehandlung mit Thiol-Antioxidantien aus gealtertem  
Knoblauch-Extrakt verhindert werden kann

Dissertation  
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Lars Nill

aus  
Berlin

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Hoffmann

---

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess  
Prof. Dr. med. Ellen Hoffmann

---

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. T. Abahji

---

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

---

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2010

---

Meinen lieben Eltern

<b>Zusammenfassung</b>	7
<b>1. Einleitung</b>	9
1. 1. Hyperhomocysteinämie	9
1. 1. 1. Homocystein – Biochemie und Metabolismus	9
1. 1. 2. Definition der Hyperhomocysteinämie	11
1. 1. 3. Ursachen der Hyperhomocysteinämie	11
1. 1. 4. Hyperhomocysteinämie und kardiovaskuläres Risiko	13
1. 2. Endotheliale Funktion	14
1. 3. Mikrozirkulation / EDHF	17
1. 4. Von der endothelialen Dysfunktion zur Entstehung der Arteriosklerose	18
1. 5. Vaskuläre Pathobiologie der Hyperhomocysteinämie	21
1. 6. Oxidativer Stress und Interaktionen mit NO	21
1. 7. Therapeutische Ansätze bei Hyperhomocysteinämie-induzierter, endothelialer Dysfunktion	25
1. 7. 1. Therapie mit kombinierten B-Vitaminen	25
1. 7. 2. Therapie mit Antioxidantien	26
1. 8. Fragestellung	28
<b>2. Material und Methoden</b>	29
2. 1. Studienprotokoll	29
2. 2. Probanden	30
2. 3. Detaillierte Versuchsbeschreibung	31
2. 4. Einflussfaktoren auf die Untersuchung	32
2. 5. In der Studie verwendete Substanzen	33
2. 5. 1. Methionin	33
2. 5. 2. Aged Garlic Extract (AGE)	33
2. 5. 3. Plazebopräparat	33
2. 6. Messung der endothelialen Funktion	33
2. 6. 1. Makrovaskuläre endotheliale Funktion	34

## Inhaltsverzeichnis

---

2. 6. 2. Mikrovaskuläre endotheliale Funktion	36
2. 6. 2. 1. Laser-Doppler-Flussmessung	36
2. 6. 2. 2. Kapillarmikroskopie	39
2. 7. Statistische Analyse	41
2. 8. Zustimmung durch die Ethikkommission und die Probanden	41
<b>3. Ergebnisse</b>	42
3. 1. Homocystein/Laborparameter	42
3. 2. Ultraschall	44
3. 2. 1. Vor Behandlung mit AGE/Plazebo	44
3. 2. 2. Nach Behandlung mit AGE/Plazebo	46
3. 3. Laser-Doppler-Fluss	48
3. 3. 1. Vor Behandlung mit AGE/Plazebo	48
3. 3. 2. Nach Behandlung mit AGE/Plazebo	49
3. 4. Kapillarmikroskopie	51
3. 4. 1. Vor Behandlung mit AGE/Plazebo	51
3. 4. 2. Nach Behandlung mit AGE/Plazebo	52
<b>4. Diskussion</b>	54
4. 1. Methioninbelastung und Homocystein	54
4. 2. Akute Hyperhomocysteinämie und makrovaskuläre endotheliale Dysfunktion	55
4. 3. Akute Hyperhomocysteinämie und mikrovaskuläre endotheliale Dysfunktion	56
4. 3. 1. Laser-Doppler	56
4. 3. 2. Kapillarmikroskopie	57
4. 4. Effekte der AGE-Behandlung auf die endotheliale Funktion bei akuter Hyperhomocysteinämie	58
4. 5. Limitationen der Studie	59
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	61
<b>Lebenslauf</b>	83

## Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin
AGE	aged garlic extract
AT-II	Angiotensin II
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CAD	coronary artery disease
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBS	Cystathion- $\beta$ -Synthase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CR	capillary recruitment
CVD	cerebrovascular disease
ED	Endotheliale Dysfunktion
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EF	Endotheliale Funktion
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-I	Endothelin-I
FMD	flow-mediated vasodilation
Hcy	Homocystein
Hhcy	Hyperhomocysteinämie
LDL	low density lipoprotein
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
MTHF	Methyl-Tetrahydrofolat
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMD	nitroglycerine-mediated vasodilation
NO	„nitric oxide“/ Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OTC	L - 2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid
PAD	peripheral artery disease
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin-H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin-I <sub>2</sub> / Prostazyklin
SEM	„standard error of the median“/arithmetischer Standardfehler des Medians
SNP	„sodium nitroprussid“/ Natriumnitroprussid

Die Hyperhomocysteinämie wird zunehmend als potentieller Risikofaktor für atherothrombotische Gefäßerkrankungen in epidemiologischen und klinischen Studien erkannt. Eine Schlüsselrolle in der vaskulären Pathobiologie der Hyperhomocysteinämie spielt die Induktion der endothelialen Dysfunktion, die durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) aufgrund von erhöhtem vaskulären oxidativen Stress verursacht wird. Klinisch lässt sich die endotheliale Dysfunktion durch eine Verringerung der endothel-abhängigen Vasodilatation in der Makrozirkulation erfassen. Jedoch ist nicht bekannt, ob die Hyperhomocysteinämie auch die mikrovaskuläre endotheliale Funktion beim Menschen beeinflusst. Daher induzierten wir bei 11 gesunden Probanden durch die Gabe von Methionin eine passagere Hyperhomocysteinämie und bestimmten sowohl die makro- als auch die mikrovaskuläre Funktion vor und während akuter Hyperhomocysteinämie. Zudem untersuchten wir in einer randomisierten, Plazebo-kontrollierten und doppelblinden Cross-over-Interventionsstudie, ob eine Vorbehandlung mit gealtertem Knoblauch-Extrakt (aged garlic extract), einem Antioxidans, die makro – und mikrovaskuläre endotheliale Funktion während akuter Hyperhomocysteinämie verändert.

**Methoden:** Die makrovaskuläre endotheliale Funktion wurde mit Hilfe der Duplexsonographie anhand der fluss-vermittelten, endothelabhängigen Vasodilatation der Arteria brachialis bestimmt. Die mikrovaskuläre endotheliale Funktion wurde mittels Laser-Doppler-Flussmessung der Hautperfusion während der Iontophorese mit Azetylcholin sowie mittels Kapillarmikroskopie durch Messung der Rekrutierung von Nagelfalz-Kapillaren während postischämischer Hyperämie (Capillary Recruitment) erfasst.

**Ergebnisse:** Die orale Methionbelastung führte zu einer signifikanten Steigerung des Plasma-Homocysteins von  $5,8 \pm 0,86 \mu\text{mol/l}$  auf  $30,8 \pm 4,12 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0.05$ ). Dies geht einher mit einer signifikant verringerten fluss-vermittelten Vasodilatation der A. brachialis von  $8,13 \pm 0,82\%$  auf  $2,99 \pm 0,73\%$  ( $p = 0.0033$ ) als Ausdruck einer makrovaskulären endothelialen Dysfunktion sowie einer signifikant verringerten Acetylcholin-induzierten Zunahme der Hautperfusion (von einer  $9,73 \pm 0,68$ -fachen auf eine  $6,48 \pm 0,88$ -fache,  $p < 0.05$ ) als Ausdruck einer mikrovaskulären endothelialen Dysfunktion.

Dahingegen blieb die endothelunabhängige Vasodilatation nach Gabe von Nitroglycerin bzw. Natriumnitroprussid während akuter Hyperhomocysteinämie in beiden vaskulären Feldern unverändert.

Durch die Vorbehandlung mit gealtertem Knoblauch-Extrakt über sechs Wochen ließ sich in der Makrozirkulation (fluss-vermittelte Vasodilatation der Arteria brachialis  $8.02 \pm 1.14\%$  vor,  $6.02 \pm 1.07\%$  nach Methionin, nicht signifikant), als auch in der Mikrozirkulation (Zunahme der Hautperfusion durch Iontophorese mit Acetylcholin  $9.8 \pm 0.92$ -fach vor,  $9.2 \pm 1.1$ -fach nach Methionin, nicht signifikant) die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion verhindern, während die Placebo-behandelte Gruppe in der Makro- und Mikrozirkulation weiterhin eine endotheliale Dysfunktion nach oraler Methioninbelastung aufwies.

Die Kapillarmikroskopie zeigte sowohl vor (Capillary Recruitment von  $14 \pm 1.6\%$  auf  $9.3 \pm 2.6\%$ ,  $p > 0.05$ ), als auch nach Behandlung mit gealtertem Knoblauch-Extrakt (Capillary Recruitment von  $13.53 \pm 2.26\%$  auf  $8.08 \pm 2.25\%$ ,  $p > 0.05$ ) keinen signifikanten Unterschied des Capillary Recruitments vor und nach oraler Methioningabe.

**Schlussfolgerung:** Akute Hyperhomocysteinämie beeinträchtigt sowohl die makro- als auch die mikrovaskuläre Funktion beim Menschen. Die Vorbehandlung mit gealtertem Knoblauch-Extrakt über sechs Wochen verbessert signifikant die makro- und mikrovaskuläre endotheliale Funktion während akuter Hyperhomocysteinämie.

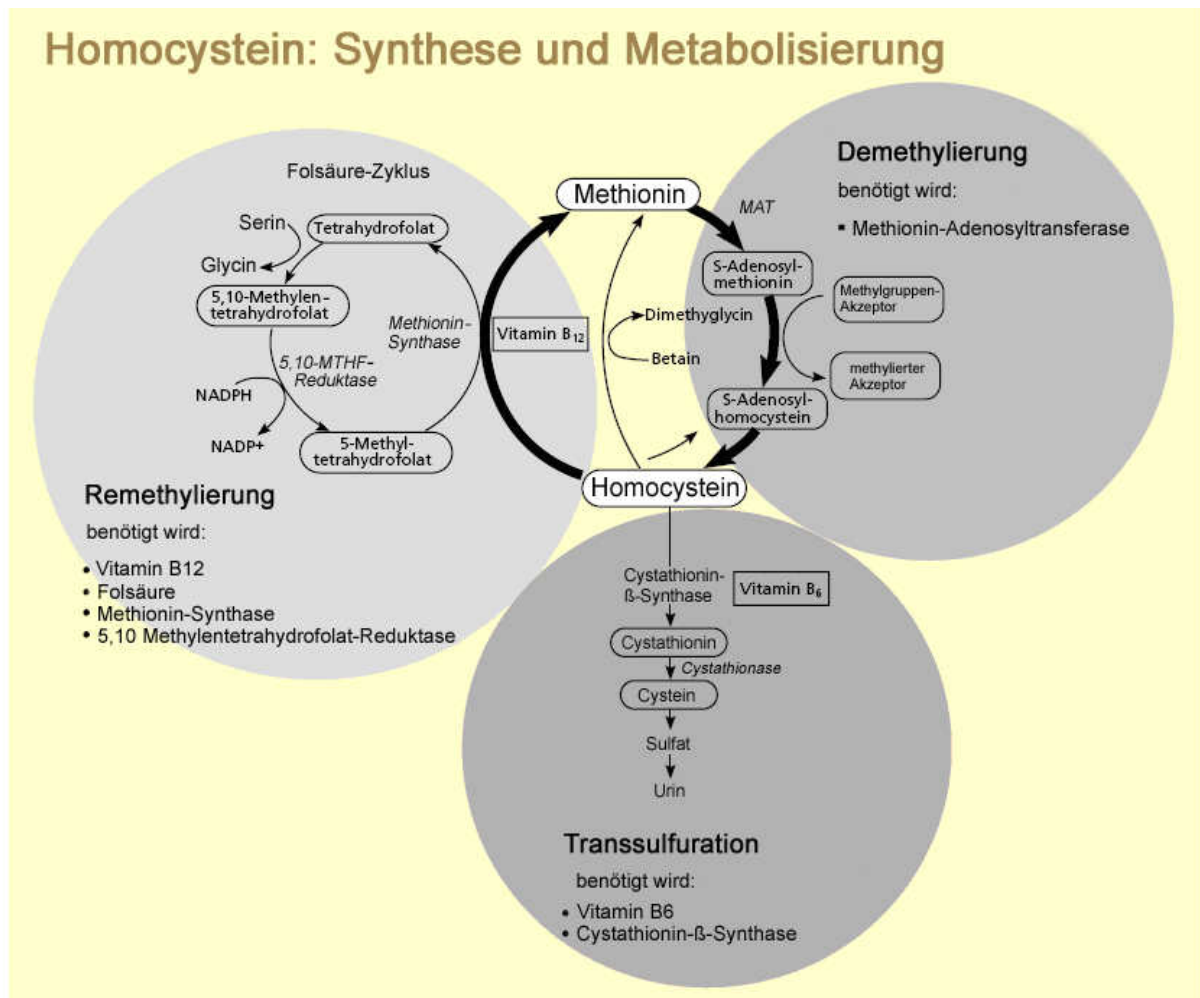


### 1. Einleitung

#### 1. 1. Hyperhomocysteinämie

##### 1. 1. 1. Homocystein - Biochemie und Metabolismus

Homocystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die im Rahmen einer Demethylierungsreaktion aus Methionin entsteht [9]. Dabei reagiert Methionin mit ATP unter der Katalyse des Magnesium-abhängigen Enzyms Methionin-Adenosyltransferase (ATP-L-Methionin-S-Adenosyltransferase; MAT) zu S-Adenosyl-L-Methionin, einem der potentesten Methylgruppen-Donatoren des menschlichen Organismus [46]. S-Adenosyl-L-Methionin wird durch Übertragung seiner Methylgruppe auf einen entsprechenden Akzeptor zu S-Adenosyl-L-Homocystein umgebaut. Durch Hydrolyse entstehen dann Homocystein und Adenosin [46]. Homocystein kann auf zwei unterschiedlichen Wegen metabolisiert werden, nämlich auf dem Remethylierungs- und dem Transsulfurationsweg. Die Remethylierung zu Methionin macht den größten Teil der Verstoffwechselung des Homocysteins aus. Diese Reaktion wird durch das Enzym Methionin-Synthase katalysiert, wobei zusätzlich Cobalamin (Vitamin B12) als prosthetische Gruppe und N5-Methyl-Tetrahydrofolat als Cofaktor (Methylgruppen-Donator) benötigt werden. Es existiert eine zweiter Remethylierungsweg, der nur in der Leber existiert und durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase katalysiert wird. Sind diese Remethylierungs-Kapazitäten ausgeschöpft, z.B. durch eine übermäßig erfolgte Produktion an Methionin oder bei einer verminderten Synthese von Cystein, wird Homocystein über den Transsulfurationsweg abgebaut [46]. Bei diesem kondensiert Homocystein mit Serin unter Katalyse des Enzyms Cystathionin- $\beta$ -Synthase zu Cystathionin. Cystathionin wird durch die Cystathionase zu Cystein hydrolysiert oder in Glutathion eingebaut. Beide Enzyme, die Cystathionin- $\beta$ -Synthase und auch die Cystathionase, sind Pyridoxin-(Vitamin B6)-abhängig. Als Abbauprodukte des Homocysteins entstehen auf diesem Weg neben Cystein noch  $\alpha$ -Ketobutyrat bzw. 2-Methyl-Citronensäure und Methyl-Malonsäure. Cystein wird im weiteren Verlauf zu Sulfat abgebaut und mit dem Urin ausgeschieden [46].



**Abbildung 1:** SYNTHESE UND METABOLISIERUNG VON HOMOCYSTEIN.

Abgeändert von BALLAL RS, JACOBSEN DW, ROBINSON K. HOMOCYSTEINE: UPDATE ON A NEW RISK FACTOR. CLEVE CLIN J MED 1997; 64:543–549.

Homocystein und Cystein kommen im Plasma in verschiedenen biochemischen Formen vor und enthalten beide eine Sulfohydryl-Gruppe (R-SH). Moleküle, die eine Sulfohydryl-Gruppe enthalten, werden auch „Thiole“ genannt. Andere biologisch relevanten Thiole sind z.B. Glutathion und Coenzym A. Unter aeroben Bedingungen (d.h. in Gegenwart von molekularem Sauerstoff als Elektron-Empfänger) und unter physiologischen pH oxidieren Thiole wie Homocystein zu Disulfiden, gemäß der Reaktion:  $2 \text{RSH} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{RS-SR} + \text{H}_2\text{O}_2$ .

Homocystein kommt also zum einen als gemischtes Disulfid (Homocystein-Cystein, Glutathion-Homocystein), aber auch als reduziertes Homocystein und als oxidiertes Homocystin im Plasma vor. Zum anderen kommt aber Homocystein neben diesen freien Formen als proteingebundenes Homocystein vor, das bei gesunden Menschen unter physiologischen Bedingungen den größten Anteil des Homocysteins mit ca. 80% ausmacht [10]. Der Anteil der freien Formen ist umso grösser, je höher die Homocystein-Gesamtkonzentration (z. B. nach oraler Methioninbelastung (experimentelle Hyperhomocysteinämie) und bei homocysteinämischen Patienten) ist, da die Proteinbindung eine Sättigung erreicht [10, 11, 12, 13].

Um die Gesamtheit der im Plasma vorhandenen Formen des Homocysteins zu beschreiben, wird auch manchmal der Begriff „Homocyst(e)in“ verwendet.

### 1. 1. 2. Definition der Hyperhomocysteinämie

Aktuell existiert keine einheitliche Meinung darüber, ab welcher Plasmakonzentration man von einer Hyperhomocysteinämie spricht. Im Allgemeinen werden jedoch Plasmakonzentrationen ab 10 - 15  $\mu\text{mol/l}$  als pathologisch angesehen [15, 16, 31]. Somit spricht man bei Plasmakonzentrationen von 10(-15)  $\mu\text{mol/l}$  bis 30  $\mu\text{mol/l}$  von einer milden oder moderaten, zwischen 31-100  $\mu\text{mol/l}$  von einer mittelschweren oder intermediären und ab 100  $\mu\text{mol/l}$  von einer schweren Hyperhomocysteinämie. Die Homocystein-Plasmakonzentrationen bei Männern sind etwas höher als die bei Frauen [30].

### 1. 1. 3. Ursachen der Hyperhomocysteinämie

Die Hyperhomocysteinämie im menschlichen Organismus kann viele verschiedene Gründe haben. Bei den genetischen Ursachen ist vor allem die autosomal-rezessiv vererbte Homocystinurie zu nennen, bei der ein Mangel an Cystathionin- $\beta$ -Synthase besteht, ein Enzym, das im Transsulfurationsweg für die Umwandlung des Homocysteins zu Cystathionin zuständig ist. Bei der homozygoten Form kommt es zu geistiger Retardierung, neurologischen, ophthalmologischen und skelettalen Komplikationen und einem durch die schwere

Hyperhomocysteinämie ( $>100 \mu\text{mol/l}$ ) verursachen hohes Risiko, an vorzeitiger Arteriosklerose und venösen Thrombosen zu erkranken [38, 15].

Bei heterozygoten Genträgern wurde eine mildere Ausprägung der frühzeitig einsetzenden Arteriosklerose beobachtet [39]. Die Prävalenz für das heterozygote Auftreten wird in der Bevölkerung mit 1–2% angegeben. Als weitere genetische Ursachen sind z.B. ein Mangel an N5, N10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) oder anderen Enzymen aus dem

### Ursachen der Hyperhomocyst(e)inämie

#### Genetische Defekte:

- Hereditäre Homocystinurie  
homozygote (schwere) und heterozygote (milde) Form:
- Cystathionin- $\beta$ -Synthase –Mangel
- N5, N10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase –Mangel
- Mangel an anderen Enzymen des Methioninstoffwechsels

#### Ernährung:

- Mangel an Vitamin B12, B6 und Folsäure
- Vegetarische Diät
- Chronischer Alkoholismus

#### Erkrankungen:

- Chronische Niereninsuffizienz
- Diabetes mellitus
- Hypothyreoidismus
- Perniziöse Anämie
- Malignome (Karzinome der Mamma, des Ovars und des Pankreas, akute lymphatische Leukämie)

#### Medikamente:

- Folsäureantagonisten (Methotrexat)
- Antikonvulsiva (Phenytoin, Carbamazepin)
- Theophyllin
- Thiazide
- Nikotinsäure

Methioninstoffwechsel zu nennen. Ein Mangel an Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin B6 sowie eine vegetarische Diät und chronischer Alkoholismus stellen nutritive Ursachen dar. Im Gegensatz zur homozygoten Ausprägung der Homocystinurie, kommt es bei mäßig erhöhten

Homocystein-Plasmakonzentrationen der heterozygoten Form und des B-Vitamin- und Folsäure-Mangels zu keiner Homocystein-Ausscheidung in den Urin. Aus dieser Beobachtung heraus wurde der Begriff Hyperhomocysteinämie als vorübergehende oder permanente Erhöhung der

Homocystein-Plasmakonzentrationen definiert [46]. Während die schwere Hyperhomocysteinämie selten ist,

kommt die milde Form in etwa 5–7%

der Gesamtbevölkerung vor [40, 46].

Desweiteren führen die chronische

Niereninsuffizienz [41], der Diabetes

mellitus, der Hypothyreoidismus [40], die perniziöse Anämie und verschieden maligne

**Tabelle 1:** URSACHEN DER HYPERHOMOCYSTEINÄMIE  
Abgeändert von N. Weiss: Mild hyperhomocysteinemia  
VASA 2004;33:191-203

Erkrankungen, darunter die akute lymphatische Leukämie und Karzinome der Mamma, des Ovars und des Pankreas, zu erhöhten Homocystein-Plasmakonzentrationen [42, 43].

Bei dialysepflichtigen Patienten trägt die Hyperhomocysteinämie zu der hohen Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei [41]. Außerdem verursachen verschiedene Medikamente, z.B. Folsäureantagonisten (Methotrexat) oder Antikonvulsiva (Phenytoin), Theophyllin [44] und Zigarettenrauchen [45] erhöhte Homocystein-Konzentrationen.

### 1. 1. 4. Hyperhomocysteinämie und kardiovaskuläres Risiko

Während der letzten 20 Jahre zeigten einige retrospektive und prospektive Studien eine Assoziation von milder Hyperhomocysteinämie und atherothrombotischen Gefäßerkrankungen durch eine erhöhte Prävalenz und Inzidenz von koronaren (CAD - coronary artery disease) [15, 18, 27], zerebrovaskulären (CVD - cerebrovascular disease) [24] und peripher arteriellen (PAD - peripheral artery disease) [34] Erkrankungen, Karotis-Stenosen [23] und venösen Thromboembolien [35]. Obwohl nicht alle prospektive Studien in der Beurteilung des kardiovaskulären Risikos übereinstimmen [36, 47-51], traf die oben genannte Assoziation bei den meisten der prospektiven Studien zu, welche darüber hinaus eine Unabhängigkeit erhöhter Homocystein-Plasmakonzentrationen von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen und Hypercholesterinämie zeigten [14, 15, 17-29, 31, 33, 37]. Hyperhomocysteinämie zeigte dabei einen multiplikativen Effekt auf das kardiovaskuläre Risiko bei Zigarettenrauchern und Hypertonikern.

McCully propagierte als Erster einen Zusammenhang zwischen erhöhten Homocystein-Plasmakonzentrationen und kardiovaskulärer Erkrankung [32]. Ihm fiel bei deutlich erhöhten Homocystein-Plasmakonzentrationen ein frühzeitiges Einsetzen des arteriosklerotischen Prozesses auf. Eine Meta-Analyse von Boushey und Kollegen [15] mit Daten aus 27 Studien zeigte, dass eine Erhöhung der Plasmakonzentration von Homocystein um 5  $\mu\text{mol/l}$  oberhalb Werten von 10  $\mu\text{mol/l}$  mit einer signifikanten Risikoerhöhung von CAD (odds ratio 1.6 [95% confidence intervall:1.4-1.7]), CVD (odds ratio 1.5 [1.3-1.9]) und PAD (odds ratio 6.8 [2.9-15.8]) einhergeht. Die Autoren gingen davon aus, dass, verglichen mit anderen vaskulären Risikofaktoren, eine Erhöhung der Plasmakonzentration von Homocystein um 5  $\mu\text{mol/l}$  einer Erhöhung der Plasmakonzentration von Cholesterin um 0.5 mmol/l (20 mg/dl) gleichkomme.

Eine Fall-kontrollierte Studie, die kürzlich in neun verschiedenen europäischen Zentren durchgeführt wurde, schätzt, dass das kardiovaskuläre Risiko, welches mit der Erhöhung der Plasmakonzentration von Homocystein unter basalen Bedingungen ( $>12 \mu\text{mol/l}$ ) und nach oraler Methioninbelastung (Netto-Erhöhung  $>27 \mu\text{mol/l}$  der basalen Konzentration oder absolute Erhöhung  $>38 \mu\text{mol/l}$ ) einhergeht, vergleichbar ist mit dem Risiko, das von Nikotin oder Hyperlipidämie ausgeht. Jedoch ist es geringer einzuschätzen als jenes, das von der Hypertonie ausgeht [16]. Anhand dieser Studien wurde auch geschätzt, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von Homocystein für 10 Prozent des CAD-Risikos in der Bevölkerung verantwortlich sind [15]. Die Autoren der prospektiven Tromsø-Studie fanden eine mittlere Homocyst(e)in-Plasmakonzentration von  $12,7 \mu\text{mol/l}$  bei Patienten mit Myokardinfarkt und  $11,3 \mu\text{mol/l}$  im gesunden Kontrollkollektiv ( $p=0,0002$ ) [18, 46]. In der Physician's Health Study [27] kam man zu vergleichbaren Ergebnissen. Hier zeigte sich für Männer mit einer Homocystein-Konzentration oberhalb der 95. Perzentile ( $15,8 \mu\text{mol/l}$ ) ein relatives Risiko von 3.1, an einem Myokardinfarkt zu erkranken. Sieben Prozent der 271 in der Studie beobachteten Myokardinfarkte konnten nach Angaben der Untersucher der Hyperhomocysteinämie zugeschrieben werden.

### 1. 2. Endotheliale Funktion

Das Gefäßendothel ist eines der größten Organe im menschlichen Körper. Es kleidet als einzellige Schicht mit einer Gesamtfläche von ca.  $1000\text{m}^2$  das vaskuläre System, inklusive dem Endokard, luminal aus [128]. Die Endothelzellen fungieren als biokompatible Schutzschicht zwischen dem Gewebe und dem zirkulierenden Blut. Zur Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase setzt das Endothel auf physikalische und chemische Stimuli hin eine Reihe von bioaktiven Faktoren frei, die mit der glatten Gefäßmuskulatur interagieren [6]. Dies sind einerseits Faktoren, die zur Dilatation und Wachstumshemmung der glatten Gefäßmuskulatur führen und andererseits Faktoren, die zur Kontraktion und zur Proliferationssteigerung führen. Aus heutiger Sicht sind die relaxierenden und wachstumshemmenden Faktoren wichtig für die Senkung der kardiovaskulären Mortalität [6].

Unter diesen Faktoren sind die wichtigsten Stickstoffmonoxid (NO) bzw. EDRF (endothelium derived relaxing factor), Prostaglandin I<sub>2</sub> und EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor).

Die wichtigsten endothelialen Kontraktoren sind Endothelin-1, Angiotensin II und Prostaglandin H<sub>2</sub>. Stickstoffmonoxid (NO) wird in den Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin unter dem Einfluss der endothelialen Isoform der NO Synthase (eNOS) synthetisiert [7, 8] und als Antwort auf erhöhten Scherstress [2] und gewissen biochemischen Stimuli [3], wie Azetylcholin, Bradykinin, Serotonin oder ADP, von den Endothelzellen freigesetzt. NO spielt eine vorherrschende Rolle in der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus und Reaktivität [5]. Dies wird durch die Freisetzung des second messenger cGMP (cyclic guanosine monophosphate) und durch die Antagonisierung von Angiotensin-II (AT-II) und Endothelin-I (ET-I) erreicht, wodurch die glatte Gefäßmuskulatur erschlafft und das Gefäß sich erweitert [6]. Die Halbwertszeit von NO beträgt jedoch nur wenige Sekunden. Es reagiert mit Sauerstoff-Molekülen zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die Kurzlebigkeit erklärt auch, warum NO immer nur unmittelbar an seinem Wirkort gebildet werden kann.

Neben den oben genannten Funktionen wirkt NO vor allem antiatherothrombotisch [1, 4] durch Inhibition der:

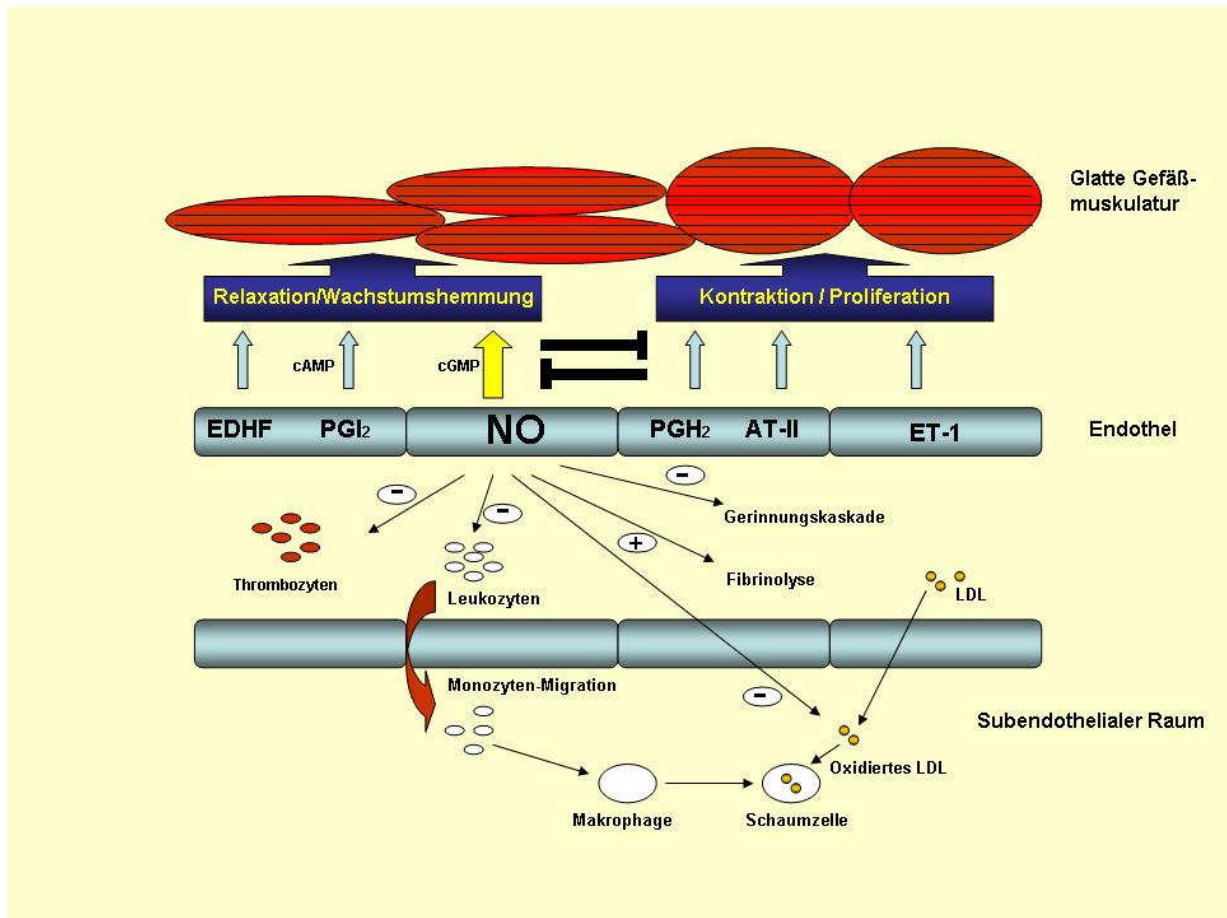
- Plättchenaktivierung (Adhäsion und Aggregation)
- Leukozytenaktivierung (Adhäsion, Aggregation und Migration):  
Hemmung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Leukozytenadhäsionsmolekülen
- Produktion von tissue factor und Faktor Va (Gerinnungskaskade)
- Proliferation der glatten Muskulatur
- Oxidierung von LDL

und Aktivierung von:

- Thrombomodulin, welches Thrombin deaktiviert, und Protein C
- Antithrombin-III und der Bindung des Gewebe-Plasminogen-Aktivators an das Endothel (Fibrinolyse)

All diese Funktionen von NO tragen zur Aufrechterhaltung eines normalen endothelialen Phänotyps und eines antithrombotischen intravaskulären und endothelialen Milieus bei [52].

Eine Verringerung der Bioverfügbarkeit von NO führt zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Funktion, dem ersten Schritt in der Entwicklung der Arteriosklerose.



**Abbildung 2:** ENDOTHELIALE FUNKTION UND DIE EFFEKTE VON NO AUF DIE VASKULÄRE HOMÖOSTASE.

NO diffundiert durch die basolaterale Membran und bewirkt in der glatten Gefäßmuskulatur eine Aktivierung der Guanylatcyclase, welche den Botenstoff cGMP (3,5-cyclic guanosine monophosphate) bildet. Dies führt zu einer Erschlaffung der Gefäßmuskulatur - das Gefäß erweitert sich. Im Gefäßlumen hemmt NO die Thrombozytenaggregation und -adhäsion, sowie die Monozyten- und Neutrophilen- Adhäsion und -Migration in den subendothelialen Raum. Monozyten-Migration und Transformation in Makrophagen / Schaumzellen ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose. Im subendothelialen Raum verhindert NO die Oxidation von LDL, während Superoxid-Anionen diese Reaktion fördern.



### 1. 3. Mikrozirkulation / EDHF

Die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation ist durch die gemeinsame pharmakologische Blockade der endothelialen NO- und Prostaglandin-Produktion unter den meisten experimentellen Bedingungen nicht komplett hemmbar [167, 168], so dass mindestens noch ein weiterer endothelialer dilatierender Faktor existieren muss, der vor allem in der Mikrozirkulation eine wichtige Rolle spielt. Er wird als “Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) bezeichnet. Urakami Harasawa et al. konnten zeigen, dass EDHF eine wichtige Rolle in der Endothel-abhängigen Vasodilatation menschlicher Arterien, besonders in der Mikrozirkulation, spielt. Je kleiner der Gefäßdurchmesser, umso größer der Einfluss von EDHF und umso kleiner der von NO [169]. EDHF hyperpolarisiert die Endothelzellen wahrscheinlich durch die Öffnung endothelialer Kaliumkanäle. Eine Hypothese besagt, dass diese Hyperpolarisierung mittels myoendothelialer Gap-Junctions an die darunterliegenden glatten Muskelzellen weitergeleitet wird. Eine andere besagt, dass EDHF die Freisetzung von Kaliumionen über endotheliale Charybdotoxin- und Apamin-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle in den myoendothelialen Spalt begünstigt. Die Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration soll über die Aktivierung einwärts gleichrichtender K<sup>+</sup>-Kanäle und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen führen. Die so verursachte Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzelle induziert den Schluss spannungsabhängiger Kalziumkanäle, so dass ein verminderter Kalziumstrom in die glatte Gefäßmuskelzelle zum Absinken der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration mit nachfolgender Relaxation führt [171, 172]. Die chemische Struktur des EDHF ist noch nicht abschließend geklärt, vermutlich existieren abhängig von Spezies, Organ und Stimulus unterschiedliche EDHF. In vielen Gefäßbetten weisen die Ergebnisse auf Derivate der Arachidonsäure, Epoxy-Eicosatriensäuren (EET), als EDHF hin, welche durch eine Cytochrom P450-Epoxygenase gebildet werden [169-172]. Ob akute Hyperhomocysteinämie EDHF beeinträchtigt, ist noch nicht geklärt. An S. De Vriese et al. konnten zeigen, dass die EDHF-vermittelte Vasodilatation in der renalen Mikrozirkulation von hyperhomocysteinämischen Ratten beeinträchtigt ist [170].

Obwohl diese Beobachtungen häufig als beeinträchtigte NO-Bioaktivität interpretiert wurden, können sie zusätzlich auch durch eine Abnormalität des EDHF-Signalwegs erklärt werden. Auch andere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie oder Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Alter beeinflussen den EDHF-Signalweg. Die Beeinträchtigung von EDHF könnte also eine entscheidende finale Komponente sein, wodurch diese Risikofaktoren Mikroangiopathien und End-Organschäden verursachen.

### 1. 4. Von der endothelialen Dysfunktion zur Entstehung der Arteriosklerose

Im Gegensatz zum funktionell intakten Endothel ist die endotheliale Dysfunktion ein initialer Schritt in der Pathogenese der Arteriosklerose und spielt eine entscheidende Rolle in deren Progression [53, 54]. Sie kann als Imbalance zwischen vasorelaxierenden und –kontrahierenden Substanzen, zwischen prokoagulierenden und antikoagulierenden Faktoren, zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren und zwischen Inhibitoren und Promotoren des vaskulären Zellwachstums charakterisiert werden.

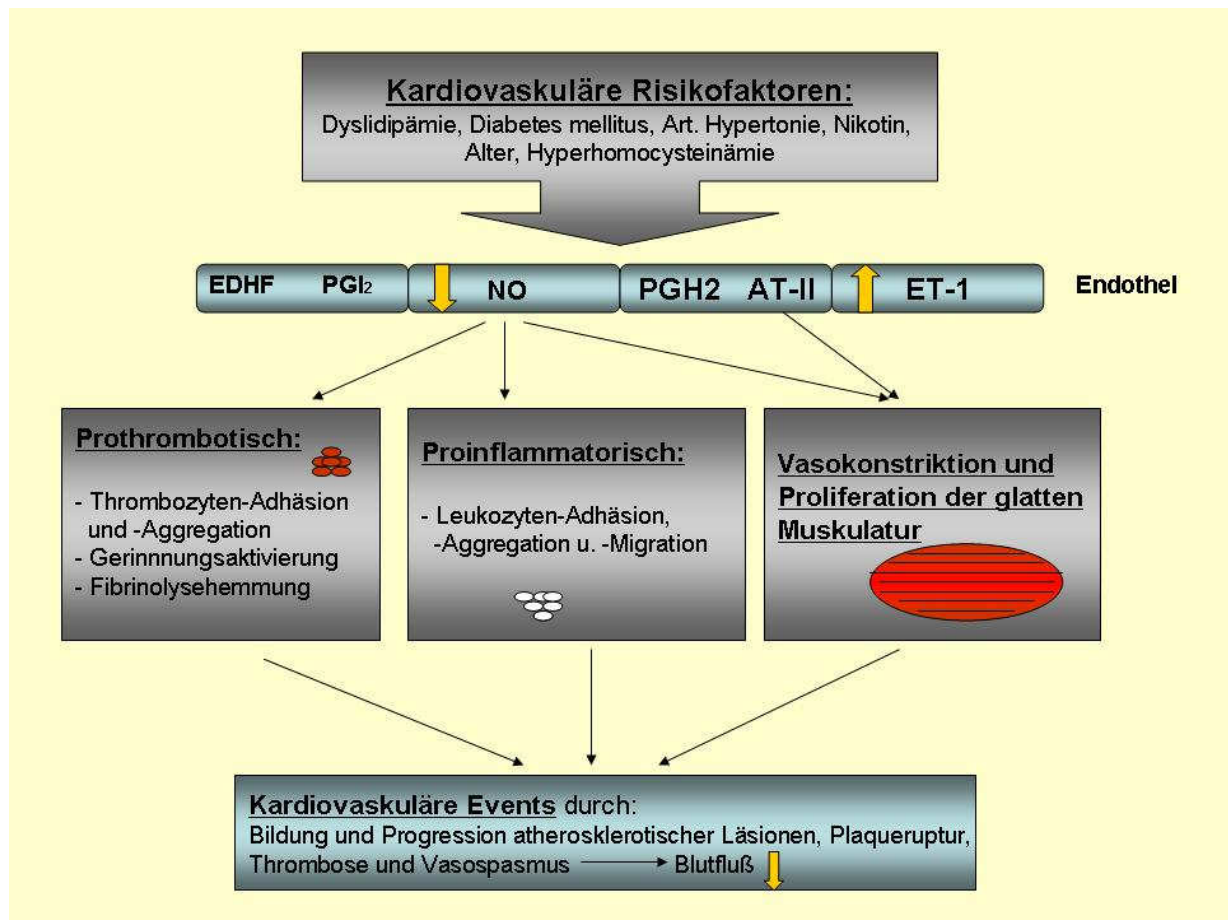
Die ED wurde in der Vergangenheit bei der Bewertung der Progression von Herz-Kreislaufkrankungen unterschätzt, gerät jedoch zunehmend [125, 126, 128, 129] als prognostischer Marker für eine beginnende Herz-Kreislaufkrankung in den Blickpunkt des Interesses. Alle kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Nikotin, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, positive Familienanamnese und eben die Hyperhomocysteinämie, führen zu einem erhöhten oxidativen Stress, welcher zu einer Abnahme in der Bioverfügbarkeit von NO führt.

Eine Schlüsselrolle der endothelialen Dysfunktion ist der Verlust der endothelabhängigen Regulierung des vaskulären Tonus, welcher ein Indiz für eben diese Verringerung der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) ist [78, 79]. Bei Patienten mit gesundem Endothel führen endothel-abhängige Stimuli (Scherstress, Ach, Bradykinin etc.) überwiegend durch Freisetzung von NO zu einer Vasodilatation.

Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder schon etablierter Arteriosklerose ist die endotheliale Dysfunktion durch verminderte Vasodilatation oder durch paradoxe Vasokonstriktion auf jene Stimuli charakterisiert [55, 56].

Dies ist durch das Ungleichgewicht zwischen kontrahierenden und relaxierenden endothelialen Faktoren zu erklären, da durch die verminderte Verfügbarkeit von NO eine Inhibition der vasokonstriktiven Faktoren wie Angiotensin-II und Endothelin-1 ausbleibt und das Endothel aufgrund einer Synthesestörung vermehrt vasokonstriktorische Moleküle produziert [129]. Durch die Abnahme der NO-Produktion in den Endothelzellen wird das sonst antithrombogen wirkende Endothel thrombogen, da Thrombomodulin, welches Thrombin hemmt, nicht mehr gebildet und Antithrombin nicht mehr aktiviert werden kann [4, 7, 8]. Außerdem kommt es neben der fehlenden Gerinnungshemmung zu einer mangelnden Fibrinolyseaktivierung, da die Plasminogen-Aktivator-Bindung nicht mehr aktiviert wird. Ebenso bleibt eine Hemmung der Plättchenaggregation bzw. -adhäsion aus. Als weitere wesentliche Auswirkung der endothelialen Dysfunktion sind die proinflammatorischen Effekte zu nennen, verursacht durch eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Chemokine oder Adhäsionsmoleküle, was in einer gesteigerten Rekrutierung und Adhäsion zirkulierender Leukozyten resultiert [4, 7, 8]. Außerdem ist die Permeabilitätssteigerung des Endothels zu erwähnen, die bei einer funktionellen sowie einer strukturellen Schädigung des Endothels durch eine Erweiterung der interendothelialen Zwischenräume entsteht [4, 7, 8].

Dies gibt bereits adhärierenden Zellen und auch Molekülen verschiedener Art die Möglichkeit, das Endothel zu passieren und subintimal angereichert zu werden. Baron und Mitarbeiter [63] stellten fest, dass die Permeabilität des Endothels auch wesentlich über thrombogene Substanzen und cGMP geregelt wird. Kommt es durch Hypoxie oder Produktion von Sauerstoffradikalen zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion und Syntheseleistung des wichtigsten Enzyms, der NO-Synthase, ist die Permeabilität automatisch mit betroffen [64–66]. So können Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, aber auch oxidierte LDL-Moleküle leichter subendothelial abgelagert werden und ihrerseits durch Synthese von Zytokinen die Permeabilität weiter erhöhen. Grundsätzlich wurde auch erkannt, dass die initialen inflammatorischen Prozesse, wie die Produktion von Histamin und Serotonin, zu einer Permeabilitätssteigerung führen, was die transendotheliale Zellmigration zusätzlich erleichtert [67].



**Abbildung 3:** DIE ROLLE DER ENDOTHELIALEN DYSFUNKTION IN DER ENTWICKLUNG ATHEROSKLEROTISCHER LÄSIONEN UND KARDIOVASKULÄRER EREIGNISSE.

Durch all diese Mechanismen wird der „Grundstein“ für eine atherosklerotische Läsion gebildet und dem Endothel eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer atherosklerotischen Plaque zugeschrieben.

Das Zusammenspiel der verschiedenen Vorgänge und insbesondere die zunehmende Zelladhäsion und subendotheliale Ablagerung von Zellen und Molekülen resultieren in einer massiven Destabilisierung der Zellstrukturen, was sich in der Ruptur einer Plaque bemerkbar machen kann. Dies führt dann zur akuten Thrombose oder Embolie.

### 1. 5. Vaskuläre Pathobiologie der Hyperhomocysteinämie

Eine Schlüsselrolle in der Homocystein-induzierten vaskulären Pathobiologie stellt, wie oben bereits erwähnt, die Induktion einer endothelialen Dysfunktion dar [13, 84].

Bei Kindern mit hereditärer Homocystinurie, bei denen stark erhöhte Plasma-Homocysteinkonzentrationen vorkommen [105], konnte eine ED gezeigt werden. Andere, wie die Arbeitsgruppe um Lentz et al. [104], konnten bei Affen, die mit einer Methionin-reichen und Folat- und Cholin-freien Diät gefüttert wurden, eine verminderte Endothel-abhängige Vasodilatation sowohl in vivo als auch in vitro nachweisen. Ebenso wurden bei Patienten mit schwerer und milder Hyperhomocysteinämie in kontrollierten klinischen Studien eine verminderte endothel-abhängige Vasodilatation in der Makrozirkulation nachgewiesen [106, 107]. In der Mikrozirkulation gelang dieser Nachweis bisher nicht. Die verantwortlichen Mechanismen für die endotheliale Dysfunktion bei Hyperhomocysteinämie sind bisher nur unzureichend verstanden. Eine breit unterstützte, aber nicht universell akzeptierte Hypothese geht davon aus, dass Hyperhomocysteinämie zu einem erhöhten oxidativen Stress in den Gefäßen führt. Dieser Effekt nimmt durch eine Verminderung der Bioverfügbarkeit des endothelialen, antiatherogenen Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle in der vaskulären Pathologie der Hyperhomocysteinämie ein.

### 1. 6. Oxidativer Stress und Interaktionen mit NO

Die Beobachtung, dass Homocystein die endothel-abhängige Vasodilatation, ausgelöst durch Scherstress, Acetylcholin oder Bradykinin, aber nicht die durch Natriumnitroprussid oder Nitroglyzerin induzierte, endothel-unabhängige Vasodilatation, beeinträchtigt, weist darauf hin, dass die Wirkung des Homocysteins auf die endotheliale Funktion auf eine Verringerung der Bioverfügbarkeit des im Endothel gebildeten NOs beruhen könnte. Diese Schlussfolgerung wird von der Beobachtung unterstützt, dass cGMP (cyclic guanosine monophosphate) in der Aorta von CBS(-/+) Mäusen mit milder Hyperhomocysteinämie im Gegensatz zu gesunden Mäusen vermindert war [57].

Außerdem waren die Endprodukte von NO, nämlich Nitrit und Nitrat, bei hyperhomocysteinämischen Probanden signifikant niedriger, als bei gesunden Kontrollpersonen [58]. Unter physiologischem Plasma-Homocysteinspiegel reagiert Homocystein mit NO, wodurch S-Nitroso-Homocystein gebildet wird, das die vasoprotektiven Effekte des NO steigert [74]. Unter hyperhomocysteinämischen Bedingungen kommt es jedoch, wie mehrere Untersuchungen zeigen konnten, zu einem erhöhten vaskulären oxidativen Stress, der zu einer Inaktivierung von NO führt [13, 40, 73, 84].

Dieser entsteht zum einen durch eine gesteigerte Oxidationsrate von Homocystein, wodurch Hydrogenperoxid entsteht, und anderen Plasma-Aminothiolen, die mit einer gesteigerten Bildung von weiteren Sauerstoffradikalen einhergeht. Zum anderen, und dies ist vermutlich quantitativ bedeutender, wird der oxidative Stress über einen biochemischen Mechanismus und abhängig von der Aktivität der endothelialen NO-Synthase durch eine Steigerung der Superoxidanion-Produktion verursacht. Letzteres geschieht durch ein „Entkoppeln“ (uncoupling) der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche daraufhin anstatt NO Superoxidanion synthetisiert [87, 100]. Superoxidanionen können aber auch über andere enzymatische Quellen, wie Xanthin-Oxidase und NADPH-Oxidase, gebildet werden.

Superoxidanion reagiert mit NO zu Peroxynitrit [76, 77], welches keine Vasorelaxation induziert, aber durch seine hohe Reaktivität zur Protein-Oxidation führt. Somit sinkt die Konzentration an NO, welches hierdurch seine Wirksamkeit im Dienste der Aufrechterhaltung der normalen endothelialen Funktion verliert. Die vermehrte Bildung von Superoxidanionen scheint eine kritische Determinante der Homocystein-induzierten endothelialen Dysfunktion zu sein, da mittels Beseitigung der Superoxidanionen durch Superoxid-Dismutase eine Reversibilität der endothelialen Dysfunktion in hyperhomocysteinämischen Tier-Modellen [57, 85] und in isolierten, mit Homocystein inkubierten, kultivierten Endothelzellen [75] gezeigt werden konnte.

Die Verbindung zwischen vaskulärem oxidativem Stress und Homocystein-induzierter endothelialer Dysfunktion wird weiterhin von „in-vivo“-Studien unterstützt, die durch Antioxidantien die normale endotheliale Funktion wiederherstellten. Hyperhomocysteinämische CBS(-/+)-Mäuse wurden entweder mit dem intrazellulären Cystein-Donor „L-2-oxo-4-Thiazolidin-Carboxylat“ behandelt, ein Agens, das die intrazellulären Konzentrationen an

reduziertem Glutathion und Thiolen erhöht und dadurch den zellulären Redox-Status zu einer reduzierteren Form hin verändert oder wurden mit Mäusen gekreuzt, die zelluläre Glutathion-Peroxidase überexprimieren. Beide antioxidativen Strategien stellten die endotheliale Funktion wieder her [60, 83]. Dieser Effekt könnte Folge einer verminderten oxidativen Inaktivierung von NO sein, da die Überexpression der zellulären Glutathion-Peroxidase in kultivierten Endothelzellen die Homocystein-induzierte Verminderung der NO-Freisetzung abschwächte [60]. Des Weiteren zeigten klinische Studien, dass eine Behandlung mit antioxidativen Vitaminen eine mit Hyperhomocysteinämie, durch orale Methioninbelastung induzierte, assoziierte endotheliale Dysfunktion verhindert [90-93]. Alles in allem lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die Effekte von Homocystein auf die endotheliale Funktion zumindest teilweise Folge der oxidativen Inaktivierung von NO ist.

Die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen wird zusätzlich noch von einer homocystein-spezifischen Inhibition wichtiger antioxidativer Enzyme, wie der Superoxid-Dismutase [80, 81] und der zellulären Isoform der Glutathion-Peroxidase [59, 82, 83], verstärkt. Letzteres Schlüsselenzym gegen oxidativen Stress benutzt Glutathion, um Hydrogenperoxide und Lipid-Peroxide zu deren entsprechenden Alkoholen zu reduzieren und kann ebenso als Peroxynitrit-Reduktase agieren.

All diese Mechanismen führen letztendlich zu einer Akkumulation von Superoxidanion und Sauerstoffradikalen, die NO durch die Bildung von Peroxynitrit oder Lipid-Peroxynitrit inaktivieren.

Ein weiterer Mechanismus, der zur verringerten Bioverfügbarkeit von NO beiträgt, ist die Erhöhung der Plasmakonzentration des endogenen NO-Synthase-Hemmers „asymmetrisches Dimethylarginin“ (ADMA) [94]. Hyperhomocysteinämische Cynomolgus-Affen [95] und Menschen zeigten erhöhte Plasma-Konzentrationen von ADMA, die mit der endothelialen Dysfunktion korrelierten [96-98], wenngleich die letzteren Daten nicht in allen Studien reproduziert werden konnten [99]. Die Inkubation von Endothelzellen mit Homocystein oder seines Vorläufers Methionin zeigte eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der ADMA-Konzentrationen, welche mit einer verminderten NO-Synthese assoziiert war. Ebenfalls war die Zunahme von ADMA mit einer verminderten Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase, dem Enzym, das ADMA degradiert, assoziiert.





## 1. 7. Therapeutische Ansätze bei Hyperhomocysteinämie-induzierter, endothelialer Dysfunktion

Zurzeit werden verschiedene Therapieansätze bei Patienten mit Hyperhomocysteinämie evaluiert.

### 1. 7. 1. Therapie mit kombinierten B-Vitaminen

Der Plasma-Homocysteinspiegel und kardiovaskuläre Erkrankungen korrelieren sehr stark und invers mit der Folsäure-Plasmakonzentration und zu einem geringeren Ausmaß invers mit den Vitamin B12/B6-Spiegeln [158, 159]. Zahlreiche klinische Studien haben gezeigt, dass die alleinige Gabe von Folsäure oder die Kombination mit anderen B-Vitaminen, unabhängig von der Ursache der Hhcy, die Plasma-Homocysteinspiegel zumindest bei Patienten mit normaler Nierenfunktion effektiv senken können [160, 161]. Durch eine kürzlich durchgeführte Meta-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass eine Folsäure-Supplementierung von 0,5–5 mg/Tag die Homocystein-Plasmakonzentrationen um 25% (95%CI: 23-28%) senken kann [162]. Eine zusätzliche Reduktion des Hcy-Spiegels konnte durch Vitamin B12 erreicht werden (mittlere Dosis: 0.5 mg), wohingegen die Vitamin B6-Gabe in einer mittleren Dosis von 16.6 mg keinen signifikanten Effekt hatte. Bereits mit täglichen Gaben von 300–400 µg Folsäure können normale bis niedrige Homocystein-Plasmakonzentrationen erreicht werden [15, 159]. Obwohl die Therapie mit Folsäure/B-Vitaminen die Homocystein-Plasmakonzentrationen signifikant und sicher senken kann, sind bis jetzt noch keine schlüssigen Daten aus randomisierten und Plazebo-kontrollierten Interventionsstudien erhältlich, die einen positiven Effekt auf die Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen beweisen. Einige ermutigende Kurzzeit-Studien untersuchten den Effekt der Vitamin-Therapie auf arteriosklerotische Marker und auf die endotheliale Funktion bei hyperhomocysteinämischen Patienten. In einer unkontrollierten Longitudinalstudie zur Beobachtung der Progression karotider Plaques bei Patienten mit ausschließlich  $Hcy > 14 \mu\text{mol/l}$  als kardiovaskulärem Risikofaktor konnte eine Zunahme der Plaques um  $0.31 \pm 0.39 \text{ cm}^2/\text{Jahr}$  verzeichnet werden, wohingegen die Plaque nach einer Vitamin-Therapie stabil blieben (Zunahme um  $-0.05 \pm 0.25 \text{ cm}^2/\text{Jahr}$ ;  $p=0.02$ ) [163].

Verschiedene doppel-blinde, randomisierte, Plazebokontrollierte Crossover-Studien untersuchten den Effekt einer oralen Folsäure-Gabe auf die endotheliale Funktion bei Hhcy-Patienten durch die mit Ultraschall gemessenen, fluss-vermittelten Endothel-abhängigen Vasodilatation der A. brachialis. Die Verringerung der Hcy-Konzentration verbesserte die FMD bei Patienten mit milder Hhcy ( $>13 \mu\text{mol/l}$ ) als alleinigen Risikofaktor [58], bei Probanden mit durch orale Methioninbelastung verursachter akuter Hhcy [164] oder bei Patienten mit manifester KHK und erhöhten Hcy-Konzentrationen [165]. Gegen diese Beobachtungen sprechen jedoch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Neuere Untersuchungen an Cynomolgus-Affen zeigten, dass eine Senkung der Homocystein-Konzentrationen bei Diät-induzierter Hyperhomocysteinämie zu keiner Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasodilatation führte [95, 104].

### 1. 7. 2. Therapie mit Antioxidantien

Bei den meisten Patienten mit Hyperhomocysteinämie und normaler Nierenfunktion führt die Gabe von Folsäure oder Vitamin B12 zu einer Normalisierung des Homocysteinspiegels und der endothelialen Dysfunktion [84]. Patienten mit Niereninsuffizienz jedoch, die ein exzessiv erhöhtes kardiovaskuläres Risiko haben, welches zumindest teilweise durch gesteigerte Plasma-Homocystein-Konzentrationen verursacht ist, sprechen nicht ausreichend auf Folsäure und Vitamin B12 an [108]. Für diese Subgruppe von Patienten werden alternative Behandlungsmöglichkeiten benötigt. Hierbei haben sich antioxidative Therapieansätze als vielversprechende Alternativen gezeigt.

Einerseits ist hier die Behandlung mit den Superoxidfängern Vitamin C und E zu erwähnen, deren Ziel nicht die Senkung erhöhter Homocystein-Plasmakonzentrationen [90], sondern die Beeinflussung der durch die Hyperhomocysteinämie ausgelösten biologischen Effekte ist.

Chambers et al. [90] konnten zeigen, dass durch die orale Gabe des antioxidativen Vitamins Ascorbinsäure eine Methionin-induzierte endotheliale Dysfunktion sowohl in den Widerstands- als auch in den Leitungsgefäßen verhindert werden konnte. Eine Verbesserung der Endothelfunktion nach Methioningabe konnte auch für eine Kombination von Vitamin E und Ascorbinsäure gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch kritisch zu beurteilen. Zum einen wurden die Untersuchungen an einer geringen Fallzahl gesunder Probanden durchgeführt und zum anderen zeigte die großangelegte Vitamin-E-Studie der Heart Outcomes

Prevention Evaluation Study Investigators [166], dass bei Patienten mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse die Behandlung mit Vitamin E über einen mittleren Zeitraum von 4,5 Jahren keinen Effekt auf das kardiovaskuläre Outcome dieser Patienten hatte.

Pharmakologische Methoden zur Steigerung des zellulären Glutathionspiegels beim Menschen bestehen in der Behandlung mit zellulären Cysteindonoren, wie N-Acetylcystein oder L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylsäure (OTC), welche die zelluläre Glutathionbiosynthese steigern. Letzterer ist effektiv, um die endotheliale Funktion bei hyperhomocysteinämischen Mäusen [83] oder bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung [109] zu normalisieren. Zudem ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gezeigt worden, dass eine antioxidative Therapie mit N-Acetylcystein kardiovaskuläre Ereignisse verringern kann [110]. Da aber Langzeitstudien zum Einsatz von OTC insbesondere bezüglich dessen Sicherheit noch fehlen, kann diese Therapie bislang noch nicht empfohlen werden.

Ein alternativer Cystein-Donor, der zelluläre Glutathionspiegel steigern kann, ist S-Allylcystein (SAC) [111]. Diese schwefelhaltige Aminosäure wurde erstmals aus einer Knoblauchpräparation durch einen zehnmonatigen natürlichen Reifungsprozess (AGE = aged garlic extract) isoliert. Seit der Erstbeschreibung von S-Allylcystein 1955 wurden in über 400 Publikationen die zahlreichen Bioaktivitäten, wie zum Beispiel Hepato- und Neuroprotektivität, Senkung des Plasma-Cholesterins und Verbesserung der humanen Immunabwehr beschrieben [112-114]. Aber herauszustreichen ist vor allem die antioxidative Wirkung. Intakter, nicht gealterter Knoblauch besteht aus schwefelhaltigen und nicht schwefelhaltigen Komponenten (Saponinen etc.). Den grössten Teil der schwefelhaltigen Komponenten stellen  $\gamma$ -Glutamyl-S-allyl-L-Cysteine und S-allyl-L-Cystein-Sulfoxide (Alliin) dar. Letztere sind Vorstufen der Thiosulfinate (wie Allicin), welche vor allem in nicht intaktem (z. B. geschnittenem) Knoblauch entstehen.

Während des oben genannten natürlichen Alterungsprozesses von bis zu 20 Monaten entsteht aus  $\gamma$ -Glutamyl-S-allyl-L-Cystein das wasserlösliche S-allyl-Cystein durch eine enzymatische Transformation mittels  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. Außerdem verringert sich hierbei auf der einen Seite die Anzahl der zytotoxischen, fettlöslichen Schwefel-Komponenten und hoch reaktive, instabile Thiosulfinate, wie Allicin, verschwinden komplett oder werden umgehend zu anderen stabilen, schwefelhaltigen Komponenten konvertiert. Auf der anderen Seite steigen die Konzentrationen der wasserlöslichen, nicht zytotoxischen Schwefel-Komponenten wie SAC und somit die Effektivität und Sicherheit im Vergleich zu nicht gealtertem Knoblauch.

AGE enthält somit überwiegend wasserlösliche Schwefel-Komponenten wie S-Allylcystein (SAC) und S-Allylmercaptocystein (SAMC) und zu einem geringen Teil fettlösliche Schwefelkomponenten [111]. Die antioxidative Wirkung beruht auf einer Modulation des Glutathion-Redox-Zyklus [115, 116]. S-Allylcystein steigert die intrazelluläre Konzentration an reduziertem Glutathion, die Aktivität der Glutathion-Disulfid-Reduktase, der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase [119]. Hierdurch wird die zellschädigende Wirkung der Superoxid-Anione und Hydrogenperoxide durch deren Abbau verhindert. Des Weiteren führt S-Allylcystein zu einer Hemmung der  $\text{Cu}^{2+}$ -abhängigen Oxidation der Low-Density-Lipoproteine (LDL) [117,118] und schützt hierdurch die Endothelzellen vor einer durch oxidiertes LDL induzierten Schädigung. Ferner kann S-Allylcystein, wahrscheinlich aufgrund der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der Suppression der Superoxid-Anion- und Hydrogenperoxid-Produktion, bioverfügbares NO steigern [120], wodurch die Thrombozytenaggregation gehemmt [121] und der Blutfluss gesteigert wird [120]. In-vitro-Untersuchungen an Endothelzellen von menschlichen Umbilikal-Venen zeigten zur Unterstützung dieser Beobachtung, dass AGE und S-Allylcystein die cGMP-Produktion signifikant erhöhen [124]. Im Tiermodell tragen alle diese Effekte zu der anti-atherosklerotischen Wirkung von S-Allylcystein bei [122, 123]. S-Allylcystein-haltige Knoblauchpräparate werden in Japan seit mehr als 40 Jahren und in zahlreichen anderen Ländern, wie z. B. USA oder Australien, seit 10 Jahren vertrieben.

Seit 1955 wird gemäß der Verkaufszahlen und der empfohlenen Dosis die Anzahl der Behandlungstage auf ca.  $1500 \times 10^6$  geschätzt. Toxische Nebenwirkungen wurden dabei weder bei der Akutbehandlung noch bei chronischem Gebrauch beschrieben.

### 1. 8. Fragestellung

1. Führt die akute Hyperhomocysteinämie nicht nur zu einer makrovaskulären, sondern auch zu einer mikrovaskulären endothelialen Dysfunktion?
2. Ist die Vorbehandlung mit dem Cystein-Donor S-Allylcystein in der Lage, die endotheliale Dysfunktion zu verhindern, die durch die akute Hyperhomocysteinämie induziert wird?

## 2. Material und Methoden

### 2. 1. Studienprotokoll

Um zu untersuchen, ob die akute Hhcy eine ED auslösen kann und diese durch AGE reversibel ist, führten wir eine doppel-blinde, Plazebo-kontrollierte Cross-over-Interventionsstudie an 11 gesunden Probanden durch. Wir unterteilten die Studie wie folgt:

#### 1. Phase (6 Wochen):

- Basisuntersuchung vor und 4 Stunden nach oraler Methioninbelastung. Randomisierung der Probanden zur Behandlung mit gereiftem Knoblauchextrakt oder Plazebo.
- Behandlung (AGE oder Plazebo) über 6 Wochen (4 ml/d)
- Erneute Untersuchung vor und 4 Stunden nach oraler Methioninbelastung

#### 2. Phase: Wash-out Phase (6 Wochen)

- Alle Probanden erhielten 6 Wochen lang keine der beiden Substanzen

#### 3. Phase (6 Wochen, Cross-over Plazebo → Verum, vice versa):

- Basisuntersuchung vor und 4 Stunden nach oraler Methioninbelastung
- Probanden, die in Phase 1 mit gereiftem Knoblauchextrakt behandelt wurden, erhielten nun Plazebo
- Probanden, die zunächst Plazebo erhielten, wurden nun mit gereiftem Knoblauchextrakt behandelt.
- Behandlung (AGE oder Plazebo) über 6 Wochen (4 ml/d)
- Erneute Untersuchung vor und 4 Stunden nach Methioninbelastung



**Abbildung 5:** GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES ZEITLICHEN ABLAUFS DER STUDIE.

## 2. 2. Probanden

Für unsere Studie untersuchten wir 11 gesunde Probanden mittleren Alters (5 Frauen, 6 Männer) ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren oder Erkrankungen.

Dies wurde durch folgende Untersuchungen bestätigt:

- Keine kardiovaskulären Erkrankungen in der Anamnese
- Normales Ruhe-EKG
- Knöchel-Arm-Doppler-Index von  $> 1,0$  und  $< 1,4$
- Keine atherosklerotischen Gefäßveränderungen bei der duplexsonographischen Untersuchung der extrakraniellen hirnversorgenden Arterien

Keine kardiovaskulären Risikofaktoren bedeutet:

- Keine arterielle Hypertonie (nach Anamnese, keine antihypertensive Therapie, Ruheblutdruck von  $< 130/80$  mm Hg)
- Nichtraucherstatus
- Normaler Blutzuckerhaushalt (nach Anamnese, keine Antidiabetika,  $HbA1c < 6,5\%$ , Nüchternblutzucker  $< 90$  mg/dl)

- Keine Fettstoffwechselstörung (nach Anamnese, keine Einnahme von Lipidsenkern, LDL-Cholesterin <130 mg/dl, Triglyzeride <180 mg/dl, HDL-Cholesterin >35 mg/dl bei Männern und >45 mg/dl bei Frauen)
- Keine chronische Hyperhomocysteinämie (Nüchtern-Homocysteinspiegel <12 µmol/l)
- Die Probanden hatten ferner ein unauffälliges Blutbild und Differentialblutbild, normale Leber- und Nierenretentionsparameter, unauffälliger Gerinnungsstatus und fehlende Entzündungszeichen.

Die Probanden durften nicht regelmäßig Medikamente, mögliche Antioxidantien oder Vitamine einnehmen.

### 2. 3. Detaillierte Versuchsbeschreibung

Die Messungen wurden bei jedem Probanden um 8:00 Uhr morgens nach einer mindestens 30 minütigen Ruhephase in liegender Position begonnen. Vor einer jeden Untersuchung wurde der Puls, der Blutdruck und die Haut- und Raumtemperatur festgehalten. Jeweils 2 Probanden pro Tag wurden untersucht, wovon einer zuerst mittels Kapillarmikroskopie, der andere zuerst mittels Laser-Doppler und anschließend vice versa untersucht wurde. Danach folgten nacheinander die Messungen am Ultraschallgerät, d. h. zuerst wurde die Mikrozirkulation, dann die Makrozirkulation untersucht.

Nach Durchlaufen der Baseline-Untersuchungen vor oraler Methioninbelastung erhielten die Probanden zur Induktion einer akuten Hyperhomocysteinämie jeweils 0.1 g/kg Körpergewicht Methionin in Apfelsaft gelöst. Nach weiteren 4-6 h wurden die Probanden dann erneut mit den drei Methoden untersucht. Zur Überprüfung des Plasma-Homocysteinspiegels wurde jeweils vor und 6-7 h nach oraler Methioninbelastung bei jedem Probanden Blut abgenommen. Außerdem wurde durch die Blutentnahme vor oraler Methioninbelastung auch die Sicherheit der Interventionsstudie mittels Routinelaboruntersuchungen, d. h. Blutbild, Leber- und Nierenparameter, überwacht.

Nach diesem Schema verfahren wir an jedem einzelnen Untersuchungstag der gesamten Studie.

## 2. 4. Einflussfaktoren auf die Untersuchung

**1. Temperatur:** Da die Temperatur einen Einfluß auf den vaskulären Tonus hat [131,132], wurde versucht, die einzelnen Phasen so gut wie möglich unter den gleichen Temperaturbedingungen durchzuführen. Die Raumtemperatur sollte zwischen 22 – 24 ° C liegen, ggf. wurde noch geheizt oder gelüftet. Die Probanden sollten weder frieren noch schwitzen. Vor jeder einzelnen Messung wurde bei jedem Probanden die Hauttemperatur der Hand mittels Digital-Thermometer (PCE-T312®) gemessen.

**2. Kaffee und Tee:** Am Untersuchungstag nahmen die Patienten weder Kaffee noch Tee zu sich. Diese Getränke führen zu einer milden Stimulation des autonomen Nervensystems [133] und haben somit einen potentiellen Einfluss auf den Gefäßtonus.

**3. Rauchen:** Wie oben bereits erwähnt, gehörte ein Nichtraucherstatus zu den Grundvoraussetzungen der Studie. Aber neben dem kardiovaskulären Risiko von Rauchern führt schon allein das Rauchen einer Zigarette zur akuten endothelialen Dysfunktion und würde somit die Untersuchungsergebnisse negativ beeinflussen [134].

**4. Einfluss von Essen:** Fettreiche Mahlzeiten und akute Hyperglykämie können zu einer akuten Verminderung der Vasodilatation führen. Deshalb führten wir die Untersuchungen am (zumindest 6 h) nüchternen Patienten durch. Nach der oralen Methioninbelastung war ein leichtes Essen erlaubt.

**5. Ruhephase:** Vor Beginn der ersten Untersuchung vor bzw. nach oraler Methioninbelastung wurde eine 30-min. Ruhephase in liegender Position eingenommen, um die Aktivität des sympathischen Nervensystems entsprechend zu reduzieren. Außerdem wurden Blutdruck und Puls dokumentiert und ggf. wiederholt gemessen, bis stabile Werte vorlagen (ggf. längere Liegezeiten).



## 2. 5. In der Studie verwendete Substanzen

### 2. 5. 1. Methionin

Die akute Hyperhomocysteinämie wurde durch orale Methioninbelastung induziert [130]. Die seit dem Vorabend nüchternen Probanden tranken hierzu 0,1g/kg Körpergewicht in Apfelsaft gelöstes Methionin.

### 2. 5. 2. Aged Garlic Extract (AGE)

Herkunft und Wirkungsweise des Medikaments wurden im Kapitel 1. 5. 2 näher erläutert. S-Allylcystein wurde oral in täglicher Dosis von 4 ml Extrakt (Kyolic® [Fa. Wakunaga Pharmaceuticals, Osaka, Japan] enthält etwa 0,5 g S-Allylcystein) verabreicht. Der typische Knoblauchgeschmack geht während des Herstellungsprozesses verloren. In kontrollierten klinischen Studien an über 1000 Menschen wurde bisher keine relevante Nebenwirkung auch bei langfristigem Gebrauch beschrieben [114, 121, 135, 136].

### 2. 5. 3. Plazebopräparat

Das Plazebopräparat bestand aus einer Lösung aus Karamell und 10% Ethanol und konnte äußerlich und geschmacklich nicht vom wahren Präparat (AGE) unterschieden werden.

## 2. 6. Messung der endothelialen Funktion

Da ein erkranktes Endothel im Frühstadium nicht morphologisch erkannt werden kann, wird die endotheliale Dysfunktion durch die Störung der endothelabhängigen Vasodilatation als Ausdruck einer verminderten Aktivität von NO aufgefasst.

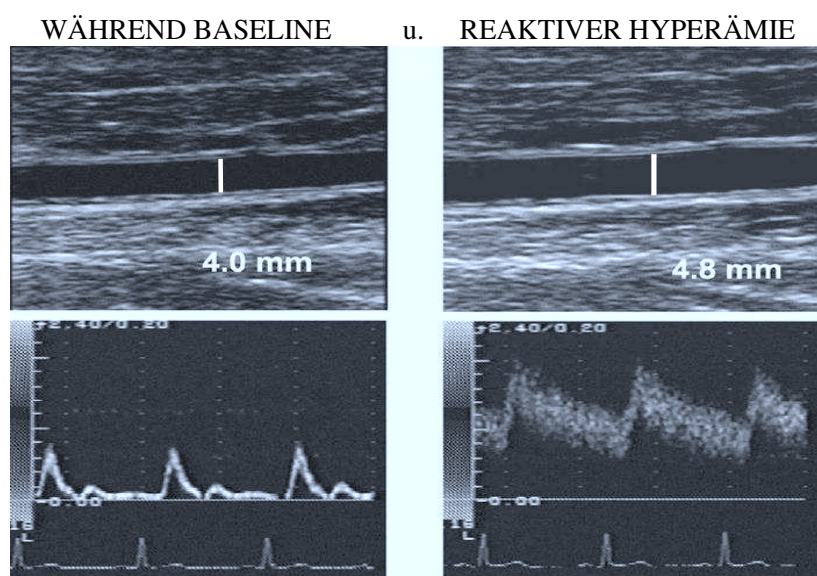
Für die Messung der makrovaskulären endothelialen Funktion stand ein hochauflösendes Ultraschallgerät zur Verfügung. Die mikrovaskuläre endotheliale Funktion wurde durch Laser-Doppler und Kapillarmikroskopie bestimmt.

### 2. 6. 1. Makrovaskuläre endotheliale Funktion

Die Untersuchung der makrovaskulären Funktion orientierte sich an der Veröffentlichung von Celermajer et al. [105]. Die hierfür verwendete Ultraschalluntersuchung an der A. brachialis ist eine weit verbreitete, nicht-invasive Methode, um die Endothel-abhängige Vasodilatation beurteilen zu können [142, 143]. Hierbei wurde durch einen geübten Untersucher der Angiologischen Abteilung der Poliklinik München mit einem Ultraschallgerät der Firma Acuson Typ 128 XP/10 (Siemens Medical Solutions USA, Inc., Mountain View, CA, USA) mit einem 7,5 MHz Schallkopf die flussassoziierte, endothelabhängige Vasodilatation (FMD: flow-mediated dilation) der Arteria brachialis vor und nach Methioninbelastung gemessen.

Nach Anlegen der EKG-Elektroden wurde die A. brachialis ca. 2-10 cm oberhalb der Ellenbeuge aufgesucht. Danach wurden zur Erfassung des Gefäßruhedurchmessers 3 separate Einstellungen (Intima-Media gut sichtbar, Abbildung 6 unten) während mindestens dreier Zyklen durchgeführt. Zur Messung der FMD wurde eine am proximalen Unterarm positionierte Blutdruckmanschette für 5 Minuten auf suprasystolische Werte (30 mmHg über Ruhe-RRsys) inflatiert. Nach plötzlicher Deflation der Blutdruckmanschette, welche eine reaktive Hyperämie herbeiführt, wurde der Durchmesser der A. brachialis innerhalb von 45-60 Sekunden gemessen.

**Abbildung 6: GEFÄSSDURCHMESSER UND FLUSS DER A. BRACHIALIS**

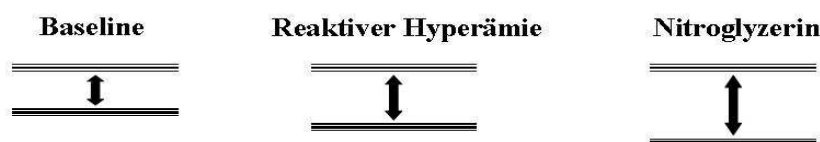


Nach einer 15-minütigen Pause erfolgte zur Erfassung der endothel-unabhängigen Vasodilatation zunächst eine sublinguale Gabe von Nitroglycerin (0,4 mg Glyceryltrinitrat ~ 1 Hub Nitrolingual bei RR > 100 mmHg). Dieses wirkt direkt auf die Zellen der glatten Muskulatur. Vier Minuten nach Applikation von Nitroglycerin wurde die endothel-unabhängige Vasodilatation durch drei separate Einstellungen der A. brachialis erfasst.

Der Gefäßdurchmesser der A.brachialis wurde innerhalb der drei separaten Einstellungen und innerhalb dreier verschiedener Zyklen offline von ein und demselben Untersucher bestimmt. Dies führte zu einer Summe von neun Einzelwerten, aus denen für jeden Proband und anschließend für die gesamte Gruppe der Median  $\pm$  S.E.M errechnet wurde. Dementsprechend wurde mit den Gefäßdurchmessern der Baseline (Ruhephase), der postokklusiven Phase (reaktiven Hyperämie) und nach sublingualer Gabe von Nitroglycerin verfahren.

Mit diesen einzelnen Medianen  $\pm$  S.E.M wurde dann die FMD und NMD (nitroglycerin-mediated vasodilation) für jeden einzelnen Probanden und für die gesamte Gruppe wie folgt berechnet:

### Gefäßdurchmesser der A. brachialis während:



$$\text{FMD} = \text{Hyperämie} - \text{Baseline} / \text{Baseline} \times 100$$

$$\text{NMD} = \text{Nitroglycerin} - \text{Baseline} / \text{Baseline} \times 100$$

**Abbildung 7:** BERECHNUNG DER FLUSS- (FMD) UND NITROGLYCERIN (NMD) - ASSOZIIERTEN VASODILATATION.

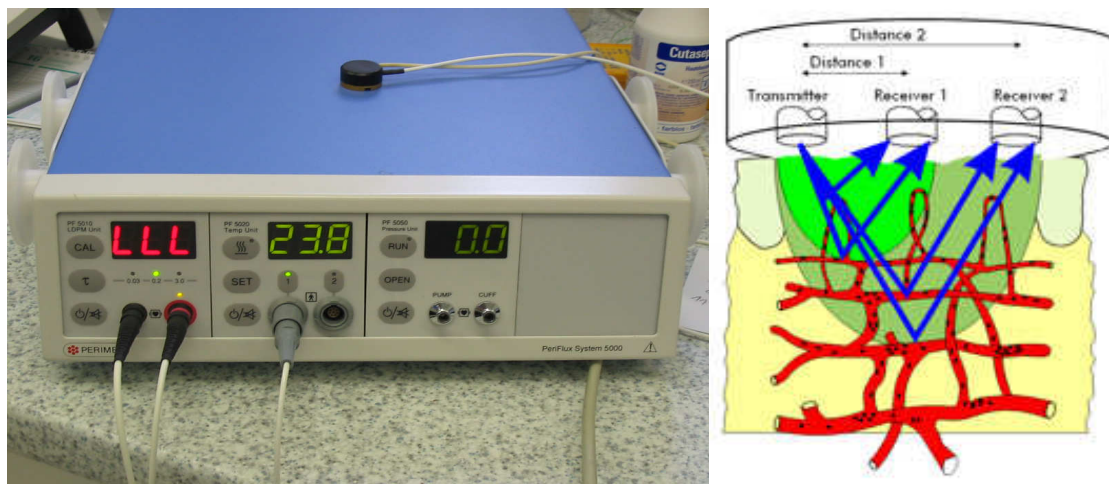
Die Werte werden in Relation zum Ausgangswert berechnet und in Prozent ausgedrückt. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde an drei von einander unabhängigen Durchgängen bestimmt. Der interindividuelle Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) der FMD der Probanden, welcher als die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert definiert ist, betrug 4.4 %.

### 2. 6. 2. Mikrovaskuläre endotheliale Funktion

Für die Bestimmung der mikrovaskulären endothelialen Funktion standen zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung: Laser-Doppler-Flussmessung und Kapillarmikroskopie.

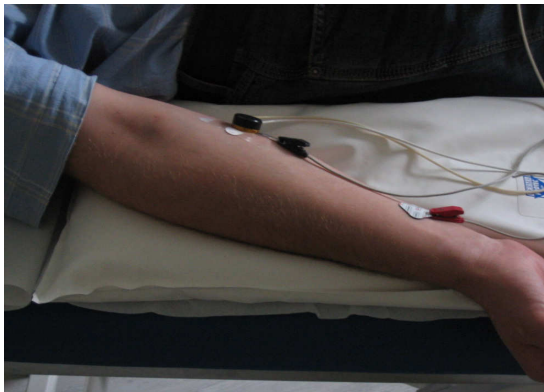
#### 2. 6. 2. 1. Laser-Doppler-Flussmessung

Mit einem Laser-Doppler-Gerät Periflux 5000 der Firma Perimed (Järfalla, Schweden), dessen monochromatischen Laserlichtquelle (750 nm) ca. 1-1.5 mm in die Haut eindringt, wurde die mikrovaskuläre Perfusion in einem definierten Hautareal des Unterarms erfasst.



**Abbildung 8 und 9:** LASER-DOPPLER-GERÄT DER FIRMA PERIMED (JÄRFALLA, SCHWEDEN) DES TYPUS PERIFLUX SYSTEM 5000 UND FUNKTIONSPRINZIP.

Anhand der Menge der frequenzverschobenen, an strömenden Erythrozyten reflektierten Laserstrahlen und dem Ausmaß der Frequenzverschiebungen lässt sich ein relatives Maß der mikrovaskulären Perfusion in Ruhe und unter Bedingungen von endothel-abhängiger (während der Iontophorese mit Acetylcholin) und endothel-unabhängiger Vasodilatation (während der Iontophorese mit Natrium-Nitroprussid) nichtinvasiv und instantan bestimmen [137, 138]. Im Rahmen der Laser-Doppler-Flowmetrie verwendeten wir im Gegensatz zur Ultraschall-Untersuchung nicht Nitroglyzerin sublingual, sondern Natrium-Nitroprussid transdermal, da dieses im Gegensatz zu Nitroglyzerin als endothel-unabhängiger Vasodilatator für die Iontophorese evaluiert wurde [174]. Azetylcholin wurde standardisiert per Iontophorese auf den linken, volaren Unterarm appliziert, Natrium-Nitroprussid auf den rechten Unterarm auf der korrespondierenden Hautstelle (kontralaterale Seite, siehe Abbildung 10). Die Iontophorese wurde mittels mikropharmakologischem Trägersystem am Kopf der Laser-Elektrode durchgeführt (Perilont, Perimed Schweden), welches mit 140 µl Azetylcholin (ACH) (1%



**Abbildung 10:** LOKALISATION DER ELEKTRODEN AM UNTERARM

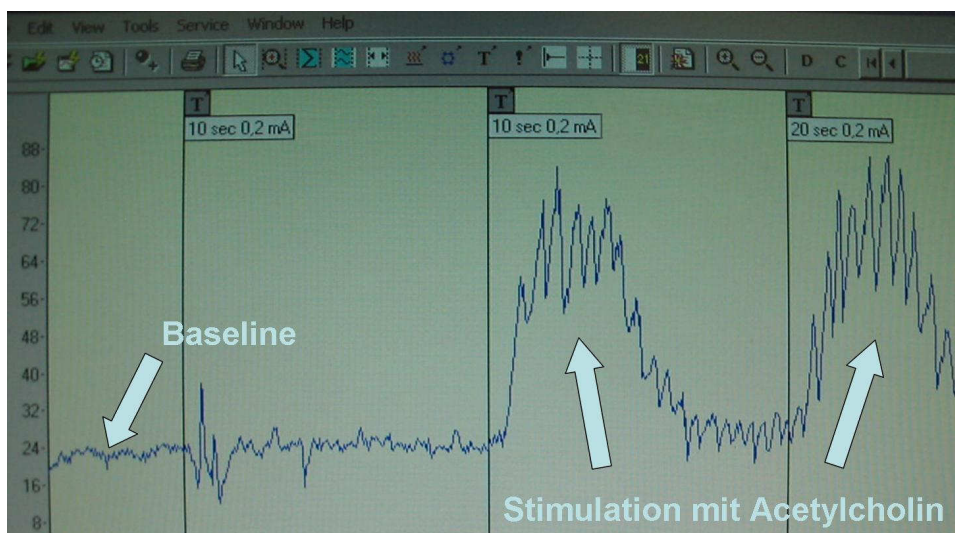
H<sub>2</sub>O(Sigma Chemicals)) bzw. mit 140 µl Natrium-Nitroprussid (SNP = sodium nitroprusside) (1% H<sub>2</sub>O (Sigma Chemicals)) getränkt wurde. Beide Chemikalien wurden in doppelt-distilliertem Wasser gelöst und während des Tages auf Eis aufbewahrt. Die SNP-Lösung wurde jeden Tag zubereitet, die ACH-Lösung wurde vor Beginn der Studie hergestellt, aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei - 20°C aufbewahrt.

Zunächst wurde die Laser-Elektrode auf 32 °C erhitzt und die Ruhe-Perfusion (Baseline) für 3 min erfasst. Danach wurde ein elektrisches Feld mit einer Ladung von 1 mAs (0.1 mA für 10 Sek.) angelegt und die Messwerte der Hautperfusion über 3 Minuten aufgenommen. Dann wurde die elektrische Ladung um zwei Stufen auf 2 mAs (0.2 mA für 10 Sek.) bzw. 4 mAs (0.2 mA für 20 Sek.) erhöht, während die Perfusion auch jeweils für 3 Minuten aufgezeichnet wurde.

Während der Untersuchung mit Azetylcholin entsprach die Laser-Elektrode der Anode und während der Untersuchung mit Natrium-Nitroprussid der Kathode.

Die Iontophorese wurde von allen Probanden gut toleriert. Um die Effekte des doppeltdestillierten Wassers auf die kutane Vasodilatation zu kontrollieren, wurde die Iontophorese des reinen Wassers einerseits mittels Anoden-Strom bei jedem Probanden und andererseits mittels Kathoden-Strom bei drei verschiedenen Probanden durchgeführt. Hierbei zeigten sich nur vernachlässigbare Veränderungen der Hautperfusion.

Die Laser-Doppler-Messungen wurden digital auf einem PC mit der Software Perisoft® der Firma Perimed aufgezeichnet und analysiert (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11:** BEISPIEL EINER IONTOPHORESE MIT AZETYLCHOLIN.

Durch die Anlage eines kurzzeitigen elektrischen Feldes kommt es zu einer passageren Zunahme der Hautperfusion.

Die endothelabhängige, ACH-induzierte Vasodilatation bzw. Zunahme der Hautperfusion wurde durch das Verhältnis von Laser-Doppler-Fluss während maximaler Stimulation (4 mAs) zum Ruhe-Fluss (Baseline) ausgedrückt (siehe obige Abbildung). Die endothel-unabhängige Vasodilatation, ausgelöst durch SNP, wurde entsprechend bestimmt. Die Daten wurden jeweils offline von derselben Person ausgewertet.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde an zwei von einander unabhängigen Durchgängen bestimmt. Der interindividuelle Variationskoeffizient der endothelabhängigen, ACH-induzierten Vasodilatation der Probanden betrug 30.3 % (n=11).



### 2. 6. 2. 2. Kapillarmikroskopie

Die Kapillarmikroskopie des Nagelfalzes wurde in dieser Studie mittels Videomikroskop der Firma KK Research Technology LTD, Model VC52-U [Abbildung 12] durchgeführt. Mit Hilfe des Kapillarmikroskops lassen sich intravital Hautkapillaren auf Höhe des Nagelfalzes beim Menschen darstellen, wobei nur die Erythrozyten-perfundierten Kapillaren kontrastgebend sind, lediglich plasmadurchströmte Kapillargefäße stellen sich nicht dar. Physiologischerweise wird nur ein Teil der kutanen Kapillaren von Erythrozyten perfundiert. Durch eine reaktive Hyperämie nach suprasystolischer Stauung kommt es zu einer Zunahme der erythrozytenperfundierten und damit sichtbaren Kapillaren. Dieses Phänomen wird auch „capillary recruitment“ bezeichnet und ist ein Maß für die mikrovaskuläre endotheliale Funktion [137, 139].



**Abbildung 12:** VIDEOMIKROSKOP DER FIRMA KK RESEARCH TECHNOLOGY LTD, MODEL VC52-U.

Zu Beginn der Untersuchung wurde eine Säuglings-Blutdruckmanschette (Cuff) am proximalen Mittelfinger der linken Hand angebracht und der Finger daraufhin auf Herzhöhe unter das Mikroskop gelegt. Nachdem man die Mitte des Nagelfalzes des Mittelfingerendgliedes aufgesucht hatte, wurde davon ausgehend zwei Gesichtsfelder nach proximal geschwenkt und eine leicht wiederzuerkennende Kapillare, eine sogenannte „eye-catching capillary“ (ECC), in die Mitte des Gesichtsfeldes positioniert. Nun wurde die Ruhephase des ersten Gesichtsfeldes (Feld A) aufgezeichnet. Die Aufnahmezeit der jeweiligen Video-Sequenzen betrug 15 Sekunden.

Aufgenommen wurde in einem 1mm<sup>2</sup> großen Areal des Nagelfalzes. Danach wurde für 4 min suprasystolisch gestaut und instantan nach Lösung der Okklusion wiederum für 15 sec die poststenotische Phase (endothelabhängige Kapillar-Rekrutierung) aufgenommen. Nach 10 minütiger Pause, in der der Proband die Hand frei bewegen konnte, wurde die vorherige ECC aufgesucht und von dort ein Gesichtsfeld nach rechts geschwenkt (Feld B). Daraufhin folgte die gleiche Prozedur wie bei Feld A. Nach erneuter 10-minütiger Pause wurde die endothelunabhängige Kapillar-Rekrutierung bestimmt. Hierzu wurde der Cuff auf 60 mmHg inflatiert und nach 60 sec. die „venous congestion“ des Feldes A und B aufgezeichnet. Die Anzahl der während der venösen Stauung (venous congestion) sichtbaren Kapillaren ist ein Maß für die maximale Rekrutierung an Erythrozyten-perfundierten Kapillaren. Sie entspricht dem Nitroglyzerin der Ultraschall- und dem Natrium-Nitroprussid der Laser-Doppler-Untersuchung, d. h. wir setzten sie in dieser Studie als endothelunabhängige Untersuchung in direkten Vergleich zu der endothelabhängigen Kapillar-Rekrutierung. Vier Stunden nach oraler Methioninbelastung wurde die Untersuchung wiederholt, wobei wieder ein und dieselbe ECC eines jeden Probanden / Feldes aufgesucht wurde. Die Auswertung der einzelnen Videosequenzen erfolgte mittels Software der Firma Capiscope®. Hierfür wurde die Anzahl der Kapillaren im Gesichtsfeld der Ruhephase, der postokklusiven Phase (nach suprasystolischer Stauung) und der „venous congestion“ offline in einem Standbild der Videoaufzeichnung und während der 15 sec. langen Videoaufzeichnung, die Auskunft darüber gab, ob eine Kapillare permanent oder intermittierend perfundiert ist, bestimmt. Die größte Kapillarzunahme erscheint unmittelbar nach Lösung der Okklusion (instantan). Intermittierend perfundierte Kapillaren wurden nicht in die Auszählung miteingeschlossen. Die Kapillaren während der Ruhe- und postokklusiven Phase und der „venous congestion“ wurden bei jedem Probanden und innerhalb eines jeden Gesichtsfeldes (A und B) in ein und demselben Areal ausgezählt. Vier Stunden nach oraler Methioninbelastung wurde nach Aufsuchen der ECC dasselbe Areal gebildet. Die Kapillardichte wurde als Zahl der erythrozyten-perfundierten Kapillaren pro mm<sup>2</sup> definiert.

Das „capillary recruitment“ errechnet sich wie folgt:

$$\frac{(\text{Kapillardichte während reaktiver Hyperämie} - \text{Kapillardichte während der Ruhephase}) \times 100}{\text{Kapillardichte während der Ruhephase}}$$



Es ist somit die Zunahme der Kapillardichte während reaktiver Hyperämie in Prozent. Die Kapillardichte der „venous congestion“ wurde ebenfalls in Relation zur Kapillardichte der Ruhephase gesetzt, um einen direkten Vergleich der endothelunabhängigen Vasodilatation zum „capillary recruitment“ zu erhalten. Die Daten der beiden Gesichtsfelder A und B wurden gemittelt und danach wurde der Median $\pm$ S.E.M. für die gesamte Gruppe vor und nach oraler Methioninbelastung berechnet. Die Auszählung wurde immer von derselben Person durchgeführt. Der interindividuelle Variationskoeffizient des „capillary recruitments“ unserer Probanden betrug 52 % (n=11).

### 2. 7. Statistische Analyse

Die Daten vor und nach oraler Methioninbelastung und vor und nach Behandlung mit AGE bzw. Plazebo wurden jeweils für alle Probanden und für die gesamte Gruppe als Median $\pm$ S.E.M (standard error of the median) angegeben. Für den Vergleich dieser Daten wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für verbundene Daten herangezogen. Werte für  $p < 0.05$  wurden als signifikant unterschiedlich interpretiert. Für die statistischen Analysen wurde SPSS 12.0 und die Software von STATVIEW® (Abacus Concepts, Berkely, CA, USA) verwendet, für die Grafiken die Software Sigmaplot®.

### 2. 8. Zustimmung durch die Ethikkommission und die Probanden

Die Untersuchung der teilnehmenden Probanden berücksichtigte die Empfehlungen der World Medical Association Declaration of Helsinki zur Durchführung von biomedizinischer Forschung. Sowohl die Einwilligung der zuständigen Ethikkommission zur Durchführung der Untersuchungen (Ethikkommission der Med. Fakultät der LMU München), als auch die Zustimmung jedes einzelnen Probanden zur Teilnahme an der Studie lagen vor. Die Probanden wurden über das Ziel, die Dauer, die Risiken und den Ablauf der Studie aufgeklärt.

### 3. Ergebnisse

#### 3. 1. Homocystein / Laborparameter

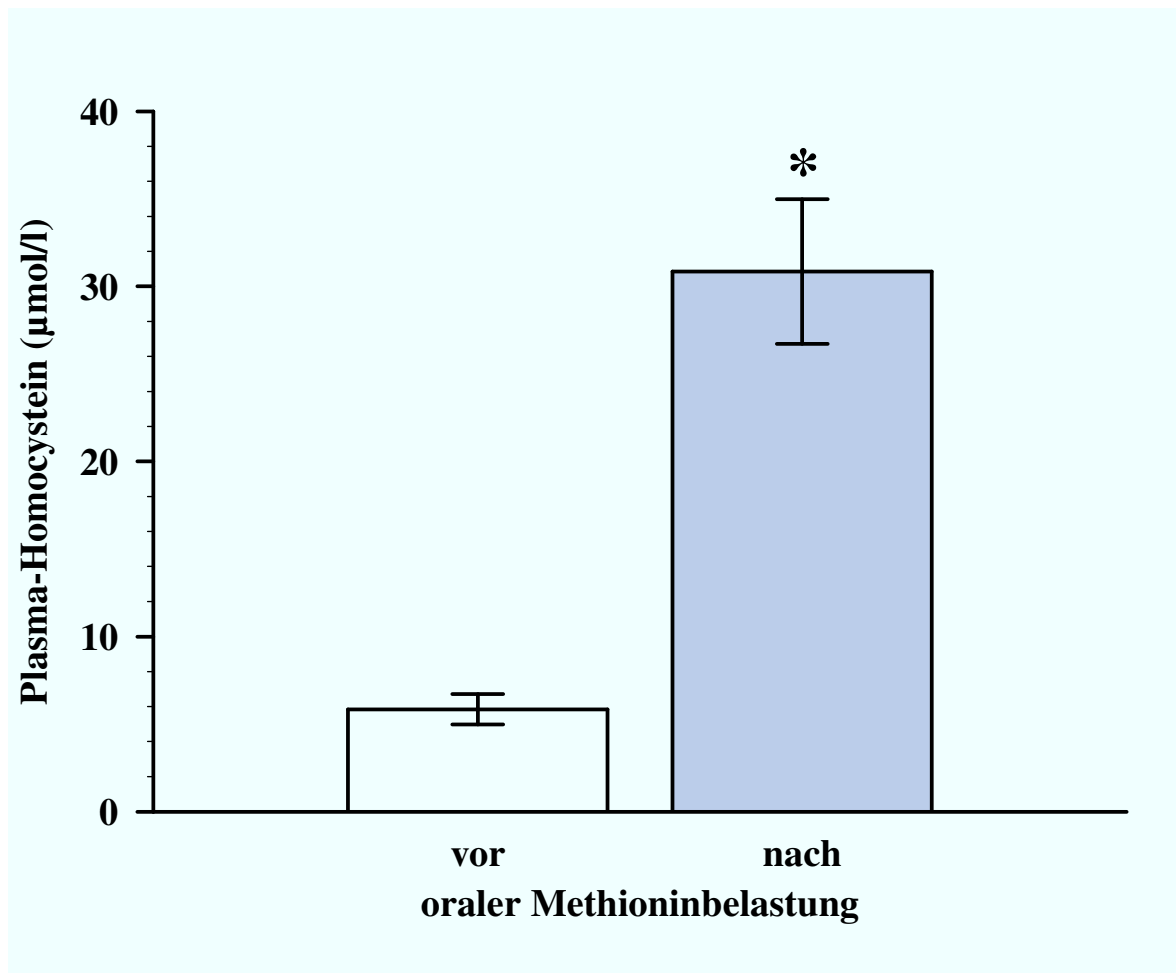
Die akute Hyperhomocysteinämie hatte keinen Effekt auf die Herzfrequenz oder den systolischen bzw. diastolischen Blutdruck [Tabelle 2]. Die orale Methioninbelastung erhöhte die Triglyceride und verringerte den HDL-Cholesterin-Spiegel hoch-signifikant ( $p < 0.01$ ), hatte aber keinen Einfluss auf den totalen oder den LDL-Cholesterinspiegel [Tabelle 2].

Parameter	Vor oraler Methioninbelastung	Nach oraler Methioninbelastung	p-Wert
Systolischer Blutdruck (mmHg)	$116.7 \pm 2.7$	$114.4 \pm 1.8$	0.534
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	$75.0 \pm 1.8$	$75.0 \pm 1.9$	0.173
Puls (pro Minute)	$65.3 \pm 2.9$	$65.0 \pm 2.6$	0.575
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	$169.5 \pm 4.9$	$169.0 \pm 5.1$	0.623
Gesamt-Triglyceride (mg/dl)	$63.0 \pm 9.4$	$117 \pm 17.8$	$< 0.01$
LDL-Cholesterin (mg/dl)	$103.5 \pm 5.6$	$100.0 \pm 4.6$	0.139
HDL-Cholesterin (mg/dl)	$48 \pm 2.8$	$42.5 \pm 2.9$	$< 0.01$

**Tabelle 2.** BLUTDRUCK, PULS UND LIPID-WERTE VOR UND NACH ORALER METHIONINBELASTUNG

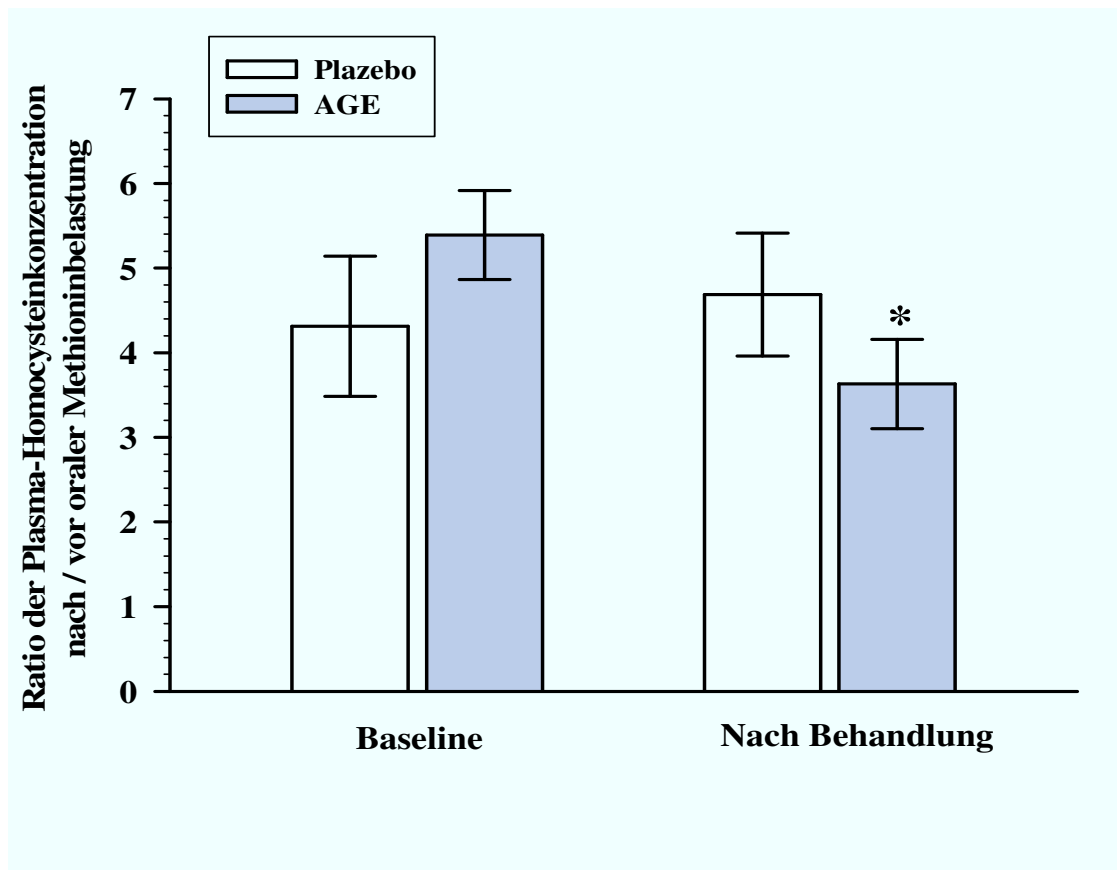
Die Messungen vor und nach Methionin während der drei Untersuchungen sind für jeden Proband und für die gesamte Gruppe als Median $\pm$ S.E.M. angegeben. N=11.

Die orale Methioninbelastung hatte eine 5,3-fache Zunahme der Plasma-Homocysteinkonzentration von  $5,8 \pm 0,86 \mu\text{mol/l}$  auf  $30,8 \pm 4,12 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0.05$ ) zur Folge. Hierfür wurden die Plasma-Hcy-Konzentrationen aller Probanden vor und nach Methioninbelastung während der Basisuntersuchungen und nach Placebobehandlung der 1. und 3. Phase der Studie herangezogen [Abb. 13] (drei Studienzeitpunkte), um dann den Median $\pm$ S.E.M. für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe zu bestimmen.



**Abbildung 13:** PLASMA-HOMOCYSTEIN-KONZENTRATIONEN VOR UND NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Plasma-Hcy-Konzentration nach oraler Methioninbelastung. Die Messungen vor und nach Methionin während der drei Studien-Zeitpunkte sind für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median±S.E.M angegeben. N=11. \* p<0.01.

Die Behandlung mit AGE hatte keinen Einfluss auf die Nüchtern-Homocysteinspiegel, jedoch wurde die Zunahme der Plasma-Homocysteinkonzentrationen nach oraler Methioninbelastung im Vergleich zur Plazebo-Gruppe signifikant um 23 % verringert (p<0.05) [Abb. 14].

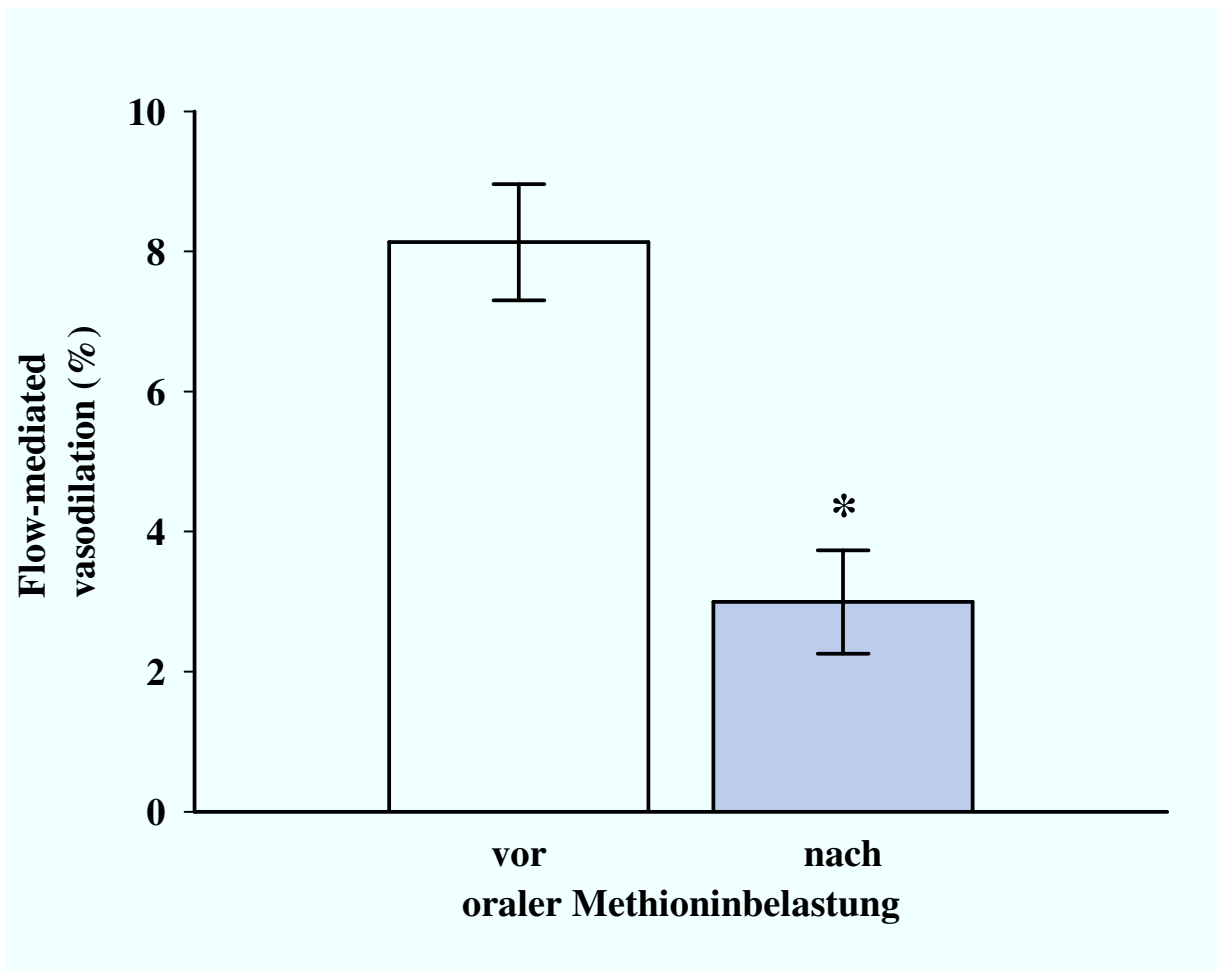


**Abbildung 14:** RATIO DER PLASMA-HOMOCYSTEINKONZENTRATION NACH/VOR ORALER METHIONINBELASTUNG VOR (BASELINE) UND NACH BEHANDLUNG MIT AGE BZW. PLAZEBO. Durch die Behandlung mit AGE kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Methionin-induzierten Hyperhomocysteinämie. Die Behandlung mit Placebo hat hingegen keinen Effekt auf die Plasma-Homocysteinkonzentration nach oraler Methioninbelastung. Die Werte sind in Median±S.E.M. für die gesamte Gruppe angegeben. N=11, \*p<0,05 vs. Baseline.

### 3. 2. Ultraschall

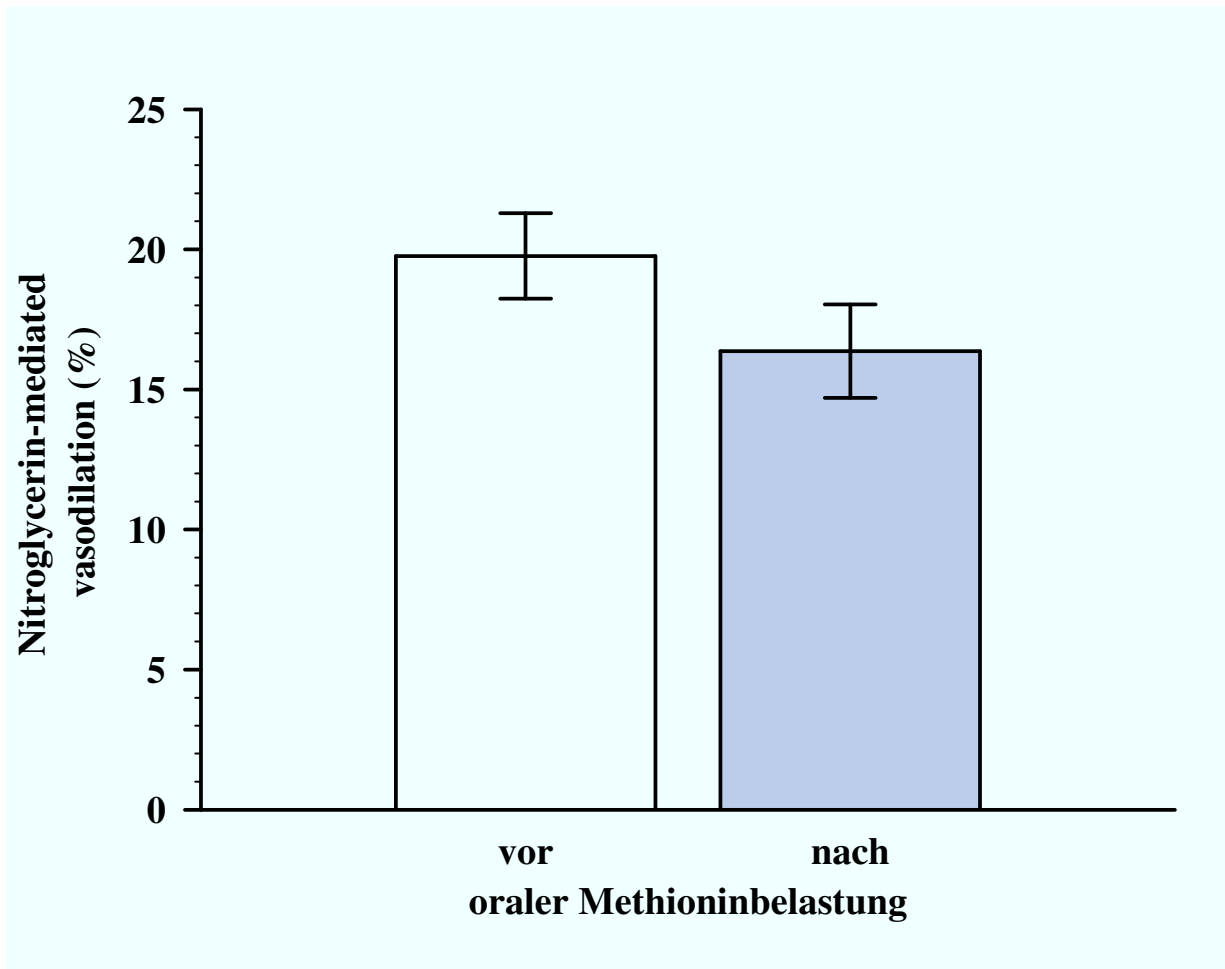
#### 3. 2. 1. Vor Behandlung mit AGE/Placebo

Durch die orale Methioninbelastung kommt es zu einer signifikanten Abnahme der FMD von  $8,13 \pm 0,82\%$  auf  $2,99 \pm 0,73\%$  (Reduktion um 63,3%) ( $p=0.0033$ ) [Abb. 15].



**Abbildung 15:** ENDOTHEL-ABHÄNGIGE FMD VOR UND 4H NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der FMD während akuter Hyperhomocysteinämie. Die Messungen vor und nach Methioninbelastung während der drei Studien-Zeitpunkte wurden für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median±S.E.M angegeben. N=11, \* p=0.0033 vs. vor oraler Methioninbelastung.

Die orale Methioninbelastung hatte hierbei keinen Effekt auf den Ruhedurchmesser der A. brachialis ( $p>0.05$ ). Die Endothel-unabhängige Vasodilatation nach Applikation von sublingualem Nitroglyzerin wurde ebenfalls nicht von der oralen Methioninbelastung beeinflusst [Abb. 16]. Dies weist darauf hin, dass die akute Hyperhomocysteinämie zwar die endothel-abhängige Vasodilatation beeinträchtigt, aber keine Auswirkung auf die endothel-unabhängige Vasodilatation der grossen Arterien, wie der A. brachialis, hat [90,91].

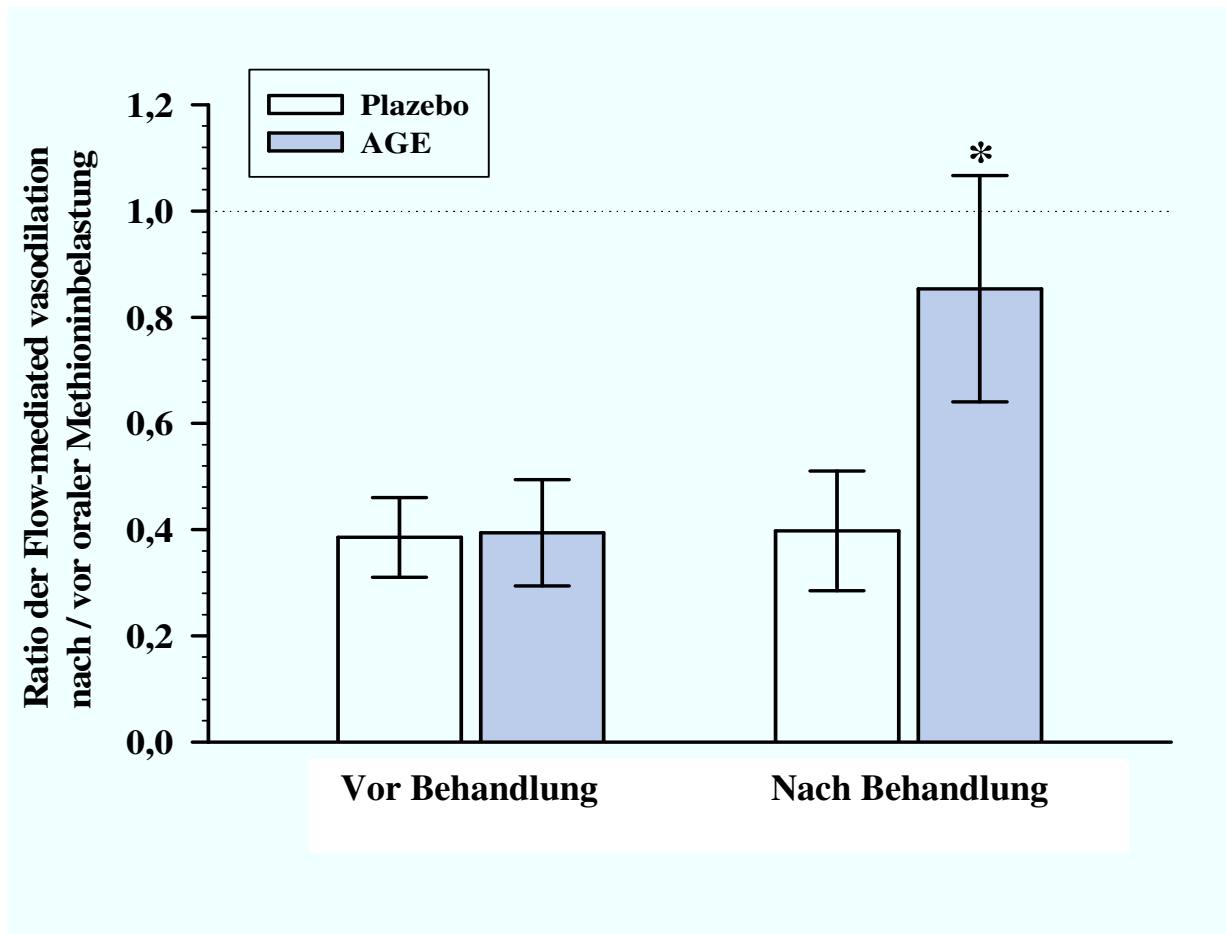


**Abbildung 16:** ENDOTHEL-UNABHÄNGIGE NITROGLYZERIN-INDUZIERTE VASODILATATION VOR UND 4H NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Diese zeigt während akuter Hyperhomocysteinämie keine signifikante Veränderung. Die Messungen vor und nach Methionin während der drei Studien-Zeitpunkte wurden für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median  $\pm$  S.E.M angegeben. N=11,  $p>0.05$  vs. vorher.

### 3. 2. 2. Nach Behandlung mit AGE/Plazebo

Die endothelabhängige Vasodilation der A. brachialis war bei Verum-behandelten Probanden nach 6 Wochen mit  $8.02 \pm 1.14\%$  vor oraler Methioninbelastung und mit  $6.02 \pm 1.07\%$  nach oraler Methioninbelastung nicht signifikant unterschiedlich ( $p>0.05$ ), wohingegen sie bei Plazebo-behandelten Probanden weiterhin von  $8.3 \pm 1.22\%$  auf  $3.3 \pm 0.88\%$  signifikant reduziert wurde ( $p<0.05$ ) [Abb. 17].

Dies kommt einer 47%- Zunahme der FMD während akuter Hhcy bei mit AGE behandelten Probanden im Vergleich zu Plazebo behandelten Probanden gleich ( $p < 0.05$  vs. Placebo).



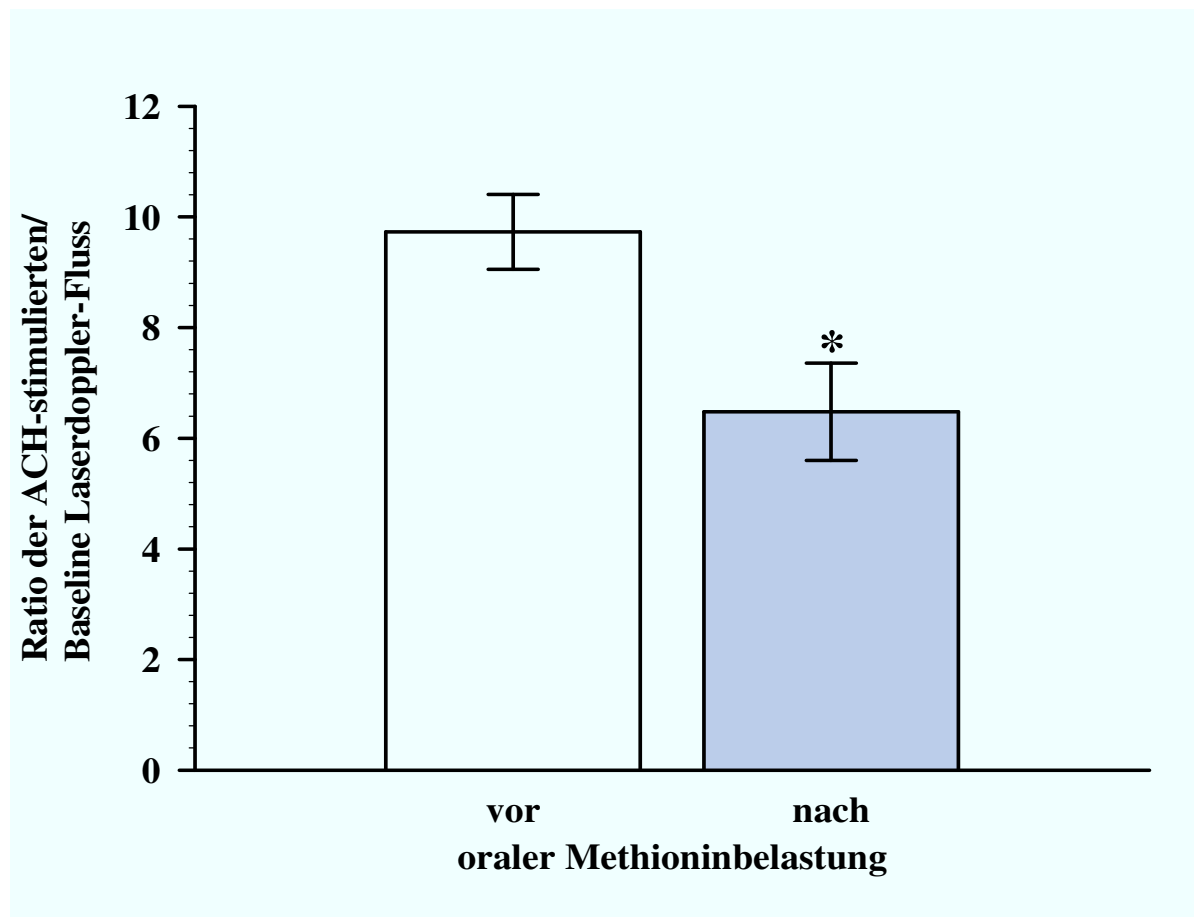
**Abbildung 17:** VERGLEICH DER RELATIVEN VERÄNDERUNG DER FMD NACH ZU VOR ORALER METHIONINBELASTUNG DER AGE- UND PLAZEBO-GRUPPE VOR UND NACH BEHANDLUNG.

Hierbei zeigt sich nach Behandlung mit AGE über 6 Wochen eine signifikante Verbesserung der FMD nach oraler Methioninbelastung im Unterschied zur Plazebo-Behandlung. Die Daten sind als Median  $\pm$  S.E.M. angegeben. N=11. Werte  $< 1.0$  zeigen eine Abnahme der FMD nach oraler Methioninbelastung im Vergleich zum Nüchtern-Zustand an. Dies ist mit einer endothelialen Dysfunktion vereinbar. \*  $p < 0.05$  vs Plazebo nach Behandlung (Wilcoxon Vorzeichen-Test).

### 3. 3. Laser-Doppler-Fluss

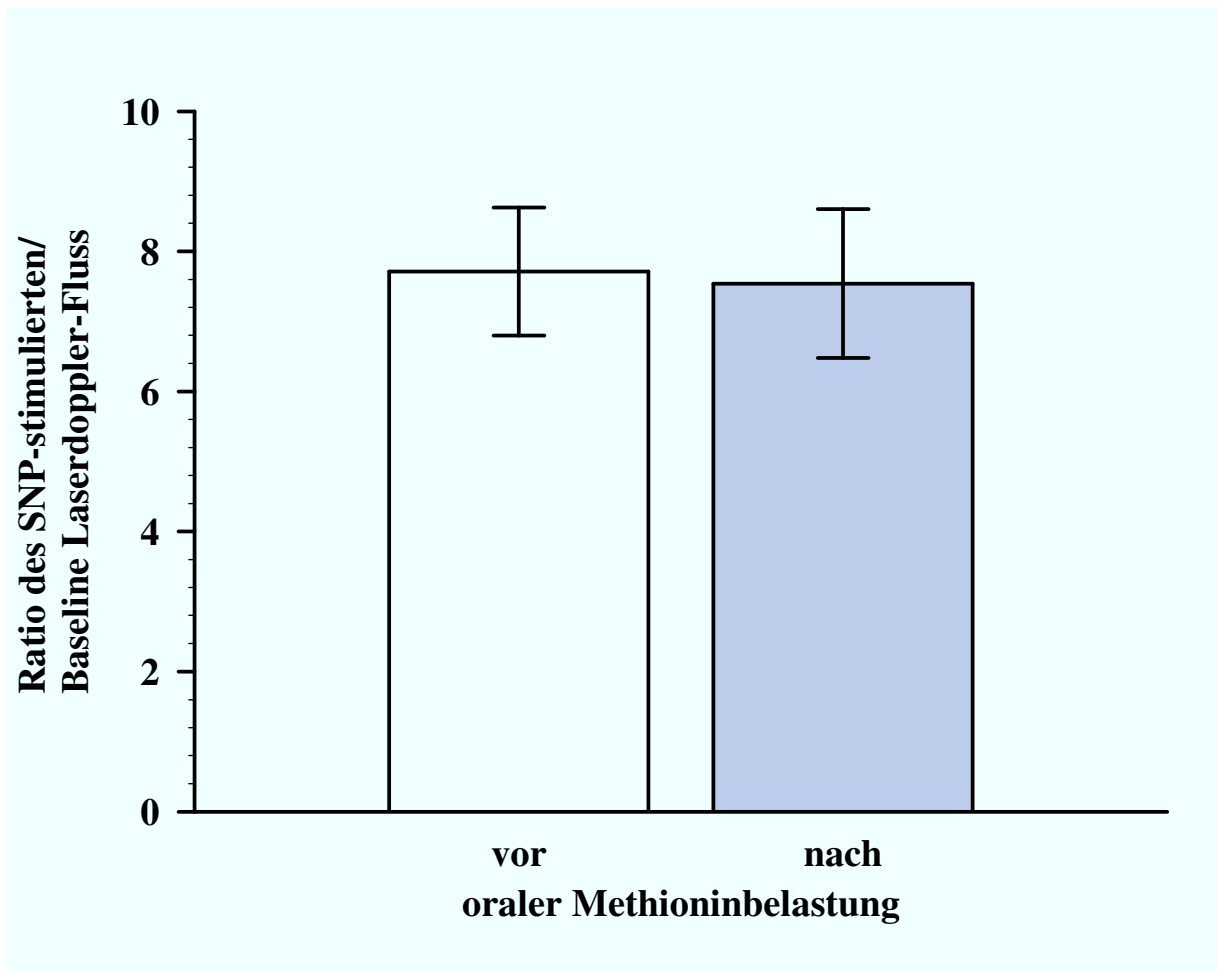
#### 3. 3. 1. Vor Behandlung mit AGE/Plazebo

Vor der oralen Methioninbelastung führte die Iontophorese mit Azetylcholin, ein Stimulator der endothel-abhängigen Vasodilatation, zu einer maximal  $9,73 \pm 0,68$ -fachen Zunahme des Laser-Doppler-Flusses, verglichen mit dem Ruhefluss. Während der akuten Hyperhomocysteinämie wurde der maximale Laser-Doppler-Fluss als Antwort auf ACh signifikant auf das  $6,48 \pm 0,88$ -fache des Ruheflusses reduziert ( $p < 0,05$ ) [Abb. 18]. Im Gegensatz dazu hatte die akute Hyperhomocysteinämie keine Auswirkungen auf die SNP-induzierte, endothelunabhängige Vasodilatation bzw. Zunahme der Hautperfusion [Abb. 19].



**Abbildung 18:** RATIO DES ENDOTHEL-ABHÄNGIGEN, ACH-INDUZIERTEN- VS. BASELINE-LASER-DOPPLER-FLUSS DES UNTERARMS VOR UND NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Die Messungen während der Studienphasen wurden für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median $\pm$ S.E.M. angegeben, N=11. \*  $p < 0,05$  vs. vor oraler Methioninbelastung.



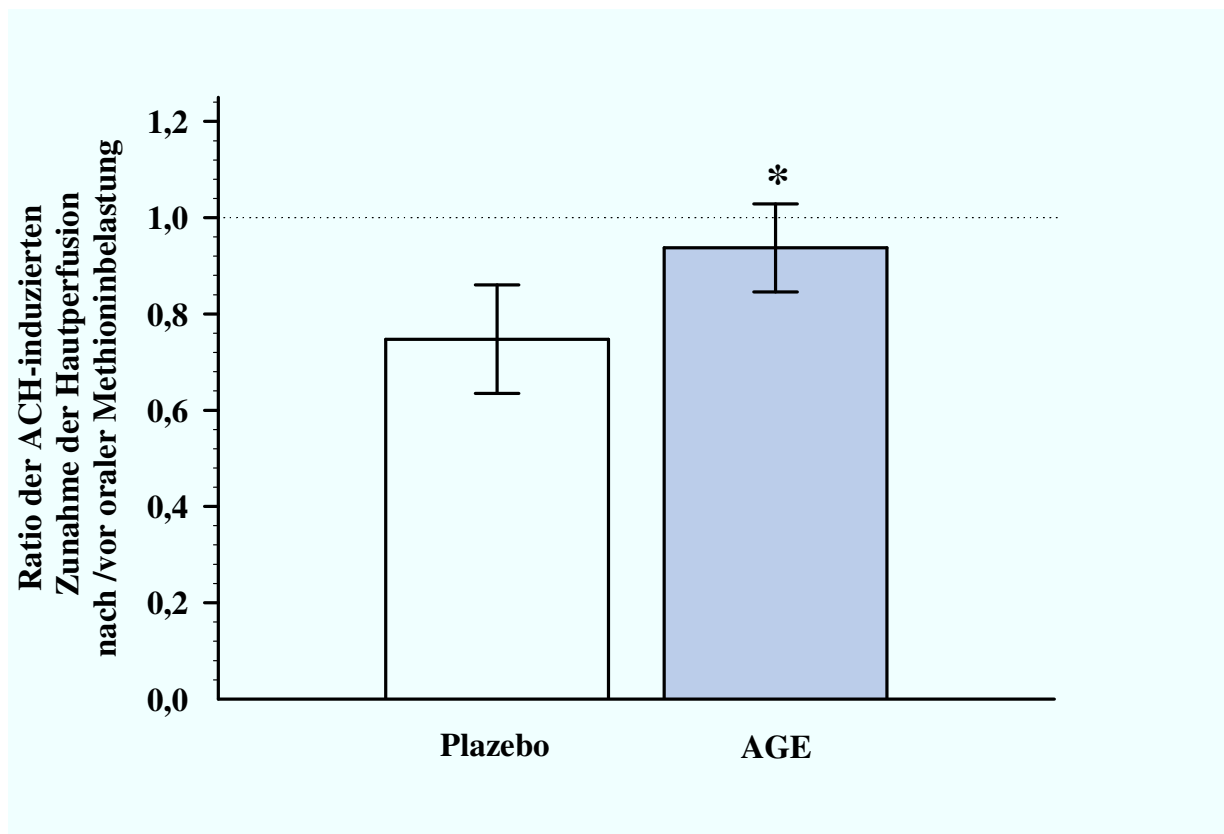


**Abbildung 19:** RATIO DES ENDOTHEL-UNABHÄNGIGEN SNP-INDUZIERTEN- VS. BASELINE LASER-DOPPLER-FLUSS DES UNTERARMS VOR UND NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied nach oraler Methioninbelastung ( $p > 0.05$ ). Die Messungen der einzelnen Studienphasen wurden für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median  $\pm$  S.E.M. angegeben. N=11.

### 3. 3. 2. Nach Behandlung mit AGE/Plazebo

Die Iontophorese mit Acetylcholin führte bei mit Plazebo behandelten Probanden zu einer  $9,2 \pm 1,25$ -fachen Zunahme des Laser-Doppler-Flusses im Nüchtern-Zustand, welche nach der oralen Methioninbelastung signifikant um 26,3 %, auf eine  $6,87 \pm 1,6$ -fache Zunahme reduziert wurde ( $p < 0.05$ ) [Abb. 20].

Nach der Behandlung mit AGE für 6 Wochen wurde die ACh-stimulierte Zunahme der Hautperfusion nur minimal von  $9,8 \pm 0,92$  vor auf  $9,2 \pm 1,1$  nach oraler Methioninbelastung reduziert. Somit zeigte die ACh-induzierte Zunahme des Laser-Doppler-Flusses während akuter Hyperhomocysteinämie keinen signifikanten Unterschied mehr, jedoch war sie signifikant größer als bei den mit Plazebo behandelten Probanden. Die Ratio der ACh-induzierten Zunahme der Hautperfusion nach/vor oraler Methioninbelastung betrug bei Plazebo  $0,747 \pm 0,112$  und bei AGE  $0,937 \pm 0,091$  ( $p < 0,05$ ) [Abb. 20]. Je geringer dieser Ratio-Wert ist, desto größer ist der Effekt der oralen Methioninbelastung auf die endotheliale mikrovaskuläre Funktion.



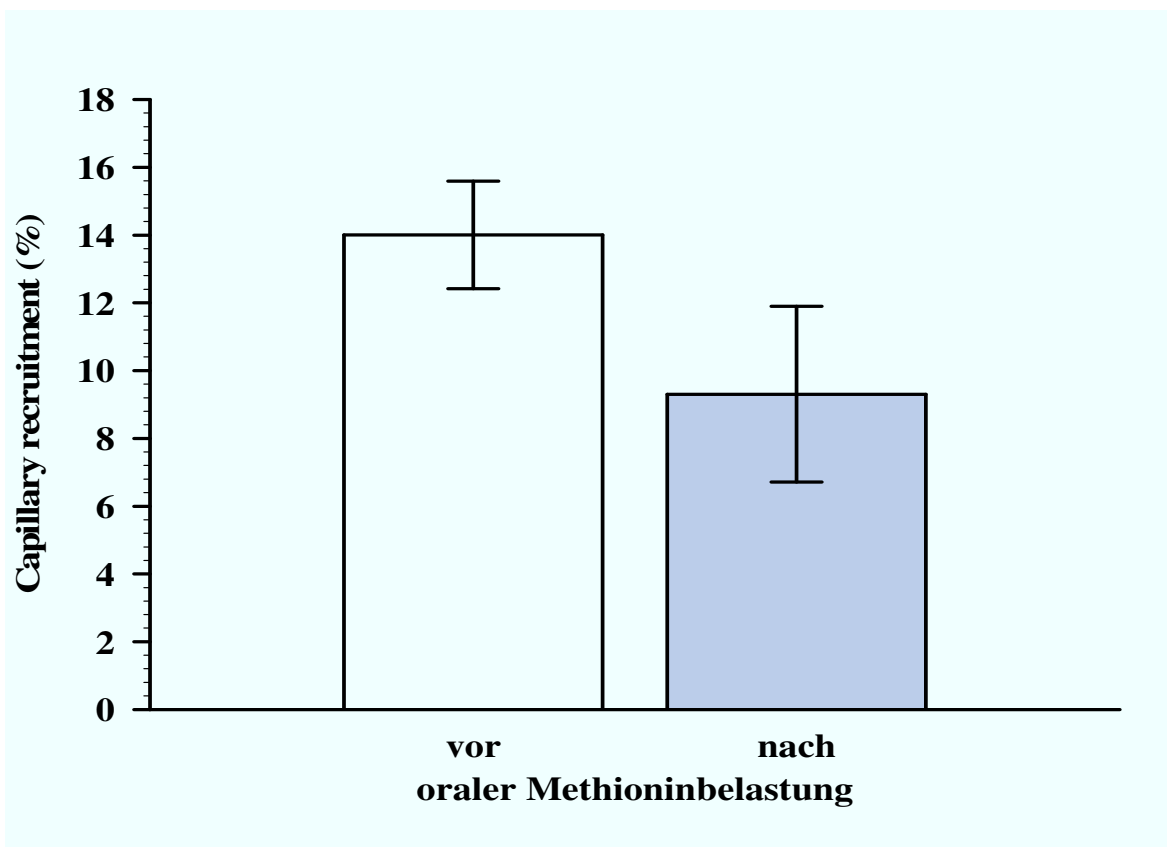
**Abbildung 20:** RELATIVE VERÄNDERUNGEN DER ACH-INDUZIERTEN ZUNAHME DER HAUTPERFUSION 4H NACH ORALER METHIONINBELASTUNG, VERGlichen MIT DEM NÜCHTERN-ZUSTAND BEI MIT PLAZEBO UND AGE BEHANDELTEN PROBANDEN AM ENDE DER BEHANDLUNGSPHASE.

Die Behandlung mit AGE zeigt hierbei eine im Vergleich zu Plazebo signifikante Verbesserung der ACh-induzierten Zunahme der Hautperfusion nach oraler Methioninbelastung,  $*p < 0,05$  vs. Plazebo nach Behandlung (Wilcoxon Vorzeichen-Test). Die Daten sind in Median $\pm$ S.E.M. angegeben, N=11. Werte unter 1,0 zeigen eine Abnahme der ACh-induzierten Zunahme der Hautperfusion nach oraler Methioninbelastung verglichen mit dem Nüchtern-Zustand an, was einer mikrovaskulären endothelialen Dysfunktion gleichkommt.

### 3. 4. Kapillarmikroskopie

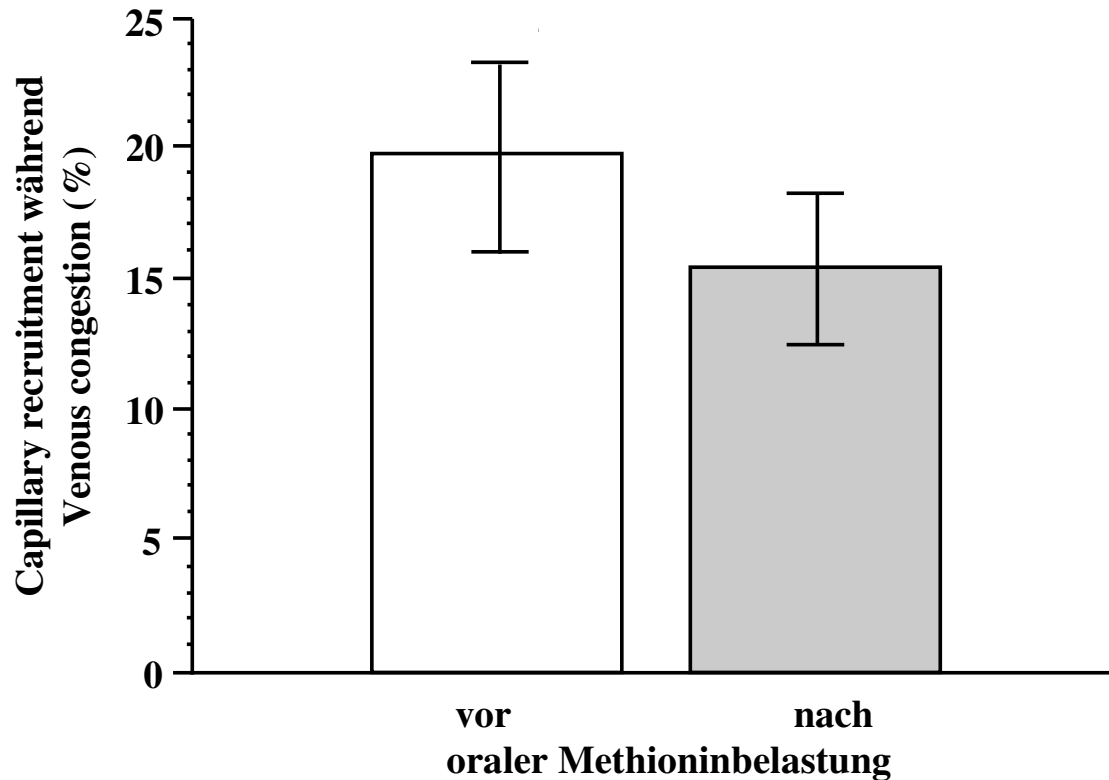
#### 3. 4. 1. Vor Behandlung mit AGE/Plazebo

Das Capillary Recruitment (CR) wurde durch die orale Methioninbelastung von  $14 \pm 1,6\%$  auf  $9,3 \pm 2,6\%$  nicht signifikant reduziert ( $p=0.0754$ ) [Abb. 21].



**Abbildung 21:** CAPILLARY RECRUITMENT VOR UND NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied während der akuten Hyperhomocysteinämie ( $p=0.0754$ ). Die Messungen vor und nach Methioningabe während der drei Untersuchungszeitpunkte wurden für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median $\pm$ S.E.M. angegeben, N=11.

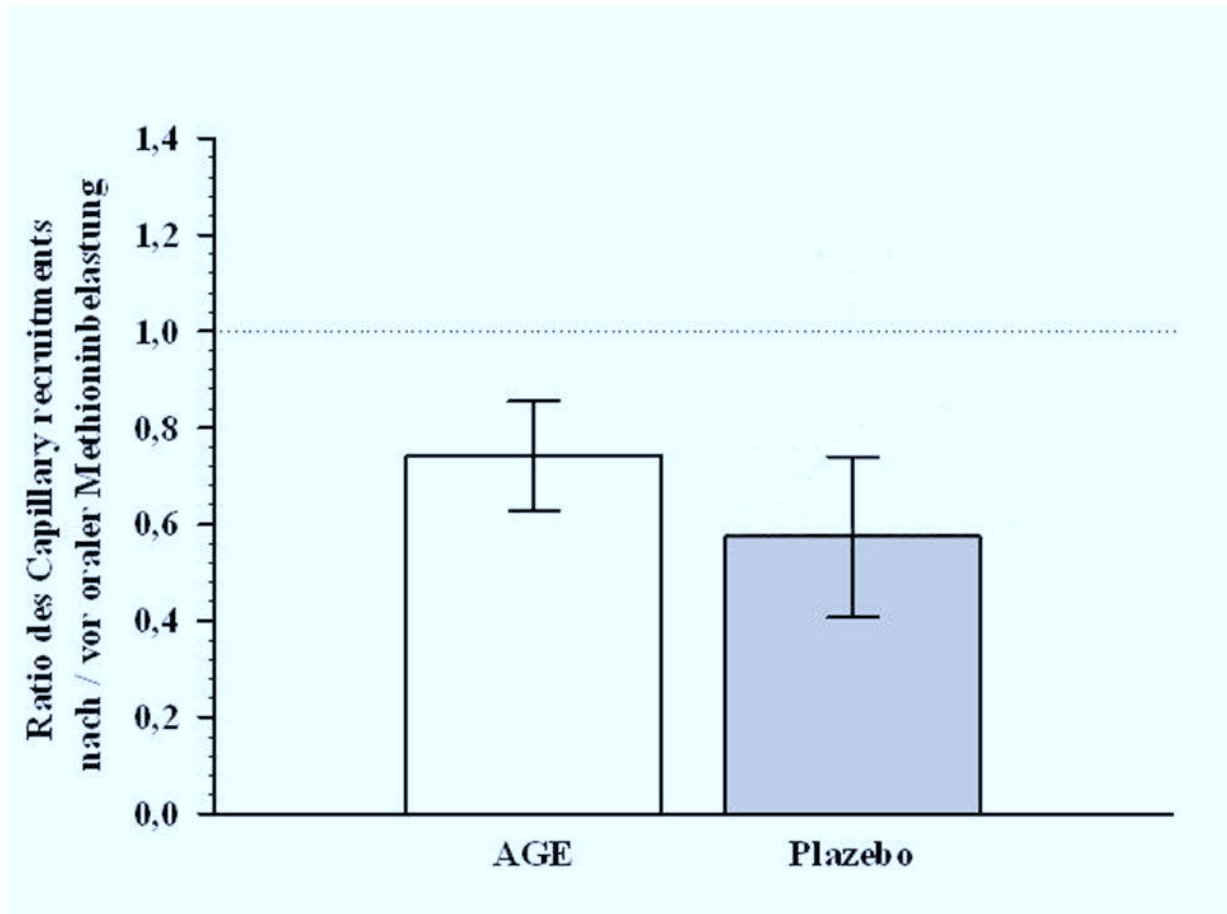
Das Capillary Recruitment während der venous congestion, d. h. das Maß für die endothelunabhängige Vasodilatation (siehe Kapitel 2. 6. 2. 2.), wurde während der akuten Hyperhomocysteinämie ebenfalls nicht signifikant von  $19,86 \pm 3,77\%$  auf  $15,19 \pm 2,72\%$  reduziert ( $p>0.05$ ) [Abb. 22].



**Abbildung 22:** CAPILLARY RECRUITMENT WÄHREND VENOUS CONGESTION VOR UND NACH ORALER METHIONINBELASTUNG. Hierbei zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied während der akuten Hyperhomocysteinämie ( $p > 0.05$ ). Die Messungen vor und nach Methioningabe während der drei Untersuchungszeitpunkte wurden für jeden Probanden und für die gesamte Gruppe als Median $\pm$ S.E.M. angegeben, N=11.

### 3. 4. 2. Nach Behandlung mit AGE/Plazebo

Das CR Plazebo-behandelter Probanden wurde während akuter Hhcy von  $13,53 \pm 2,26\%$  auf  $8,08 \pm 2,25\%$  um 40,2 % verringert ( $p = 0,3739$ ). Bei Probanden, die mit AGE vorbehandelt wurden, verringerte sich das CR nach oraler Methioninbelastung von  $13,31 \pm 2,62\%$  auf  $9,86 \pm 1,88\%$  um 25,9 % ( $p = 0.065$ ) [Abb. 23].



**Abbildung 23:** RELATIVE VERÄNDERUNGEN DES CR 4H NACH ORALER METHIONINBELASTUNG, VERGlichen MIT DEM NÜCHTERN-ZUSTAND BEI MIT PLAZEBO UND AGE BEHANDELTEN PROBANDEN AM ENDE DER BEHANDLUNGSPHASE. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit AGE und Placebo ( $p > 0.05$ ). Die Daten sind in Median $\pm$ S.E.M. für die gesamte Gruppe angegeben. Werte  $< 1.0$  zeigen eine Abnahme der CR nach oraler Methioninbelastung im Vergleich zum Nüchtern-Zustand an und sind vergleichbar mit einer endothelialen Dysfunktion. N=11.

## 4. Diskussion

### 4. 1. Methioninbelastung und Homocystein

Unsere Untersuchungen an 11 nüchternen, gesunden Probanden zeigen, dass durch eine orale Methioninbelastung mit einer Methionin-Dosis von 0,1g/kg Körpergewicht die Plasma-Homocystein-Konzentration von  $5,8 \pm 0,86 \mu\text{mol/l}$  auf  $30,8 \pm 4,12 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0.05$ ) signifikant anstieg. Diese Ergebnisse entsprechen früheren Beobachtungen an gesunden Probanden. So konnte Boger et al. [96] eine Erhöhung der Hcy-Konzentration während experimenteller Hyperhomocysteinämie nach oraler Methioninbelastung von  $6.9 \pm 0.6$  auf  $28.4 \pm 3.5 \mu\text{mol/l}$  feststellen ( $p < 0.05$ ). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kanani et al. [91] und Wanby et al. bei ihren Untersuchungen an gesunden Probanden [99].

Nach einer sechswöchigen Vorbehandlung mit AGE ließ sich in unseren Untersuchungen der Anstieg der Plasma-Hcy-Konzentration nach oraler Methioninbelastung signifikant verringern ( $p < 0.05$ ), ohne dass sich eine Auswirkung auf den Nüchtern-Hcy-Spiegel nachweisen ließ. Eine kürzlich erschienene, plazebo-kontrollierte Studie [177] an Ratten konnte zeigen, dass eine Vorbehandlung mit AGE eine Methionin-induzierte akute Hhcy verringern kann. Nach einer Vorbehandlung mit AGE (bzw. KLEN: AGE kombiniert mit Pyridoxin Hydrochlorid, Nicotinamid, Panthenol und Leber-Extrakt) über 8 Tage konnte der Anstieg der Plasma-Hcy-Konzentration nach oraler Methioninbelastung signifikant verringert werden. Nach täglicher Gabe von L-Methionin über 20 Wochen konnte KLEN, ebenfalls über 20 Wochen oral verabreicht, den Hcy-Spiegel bei Ratten signifikant um 33-56% im Vergleich zur Plazebo-Gruppe reduzieren. Eine andere Studie konnte zeigen, dass AGE die Plasma-Hcy-Konzentration signifikant um 28 bis 33 % in Ratten mit Folsäuremangel senken kann [178].

Hinsichtlich der Wirkungsweise von AGE nimmt man an, dass AGE zumindest zum Teil durch eine Stimulation der Cystathionin- $\beta$ -Synthase und durch eine Hemmung der Remethylierung durch Inaktivierung der  $N_5$ ,  $N_{10}$ -Methylenhydrofolat-Reduktase den Plasma-Homocystein-Spiegel senkt [178].

### 4. 2. Akute Hyperhomocysteinämie und makrovaskuläre endotheliale Dysfunktion

Eine endotheliale Dysfunktion der größeren Arterien und Widerstandsgefäße konnte sowohl in mehreren Tiermodellen mit milder Hyperhomocysteinämie [57, 60, 83, 104], als auch für die größeren Arterien bei Patienten mit chronischer Hyperhomocysteinämie [58, 107] nachgewiesen werden. Auch bei gesunden Probanden konnte in früheren Studien [90, 91] anhand der flussinduzierten Vasodilatation der A. brachialis gezeigt werden, dass eine durch orale Methioninbelastung induzierte akute Hhcy eine endotheliale Dysfunktion der größeren Arterien verursacht. So stellte Chambers et al. [90] während akuter Hhcy eine hochsignifikante Reduktion der FMD von  $4.3 \pm 0.7\%$  auf  $-0.7 \pm 0.8\%$  fest ( $p < 0.001$ ). Kanani et al. [91] konnte ebenfalls eine hochsignifikante Abnahme der FMD während experimenteller Hhcy verzeichnen ( $p < 0.0001$ ). Diese Ergebnisse konnten wir in unserer Studie bestätigen. Während akuter Hyperhomocysteinämie wurde die FMD der A. brachialis unserer Probanden ebenfalls hochsignifikant von  $8,13 \pm 0,82\%$  auf  $2,99 \pm 0,73\%$  reduziert ( $p = 0.0033$ ) [Abbildung 15].

Die FMD wurde mittels Duplexsonographie der A. brachialis gemessen, welche eine sehr gut etablierte Methode zur Messung der endothelialen Funktion darstellt [142, 143]. Der geringe interindividuelle Variationskoeffizient der FMD unserer Probanden von 4,4 % zeigt, dass es sich hierbei um ein sehr zuverlässiges Ergebnis handelt.

Die endothelunabhängige Vasodilatation der A. brachialis nach sublingualem Nitroglyzerin blieb während der akuten Hyperhomocysteinämie unverändert. ( $p > 0.05$ ). Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in anderen Studien finden [90, 91, 106]. So beschreibt zum Beispiel Kanani et al. [91], dass die endothelunabhängige Vasodilatation der A. brachialis und der Widerstandsgefäße am Unterarm auf Verapamil bzw. auf Natrium-Nitroprussid während akuter Hyperhomocysteinämie unverändert blieb. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass das Endothel im makrovaskulären Bereich ein zentraler Angriffspunkt im Rahmen der vaskulären Pathobiologie der Homocysteinämie darstellt.

### 4. 3. Akute Hyperhomocysteinämie und mikrovaskuläre endotheliale Dysfunktion

#### 4. 3. 1. Laser-Doppler

Inwieweit eine akute Hyperhomocysteinämie auch zu einer mikrovaskulären endothelialen Dysfunktion beim Menschen führt, wurde bisher noch nicht untersucht. Wir konnten in unserer Studie erstmals zeigen, dass es während akuter Hhcy zu einer signifikanten Abnahme der endothel-abhängigen, ACh-induzierten Flusszunahme der Hautgefäße kommt ( $p < 0.05$ ). Gleichzeitig blieb die endothelunabhängige Flusssteigerung nach Iontophorese mit Natrium-Nitroprussid unter dem Einfluss einer Hhcy unbeeinflusst ( $p > 0.05$ ). Unsere Daten zeigen, dass durch die orale Methioninbelastung nicht nur die makro-, sondern auch die mikrovaskuläre endotheliale Funktion beeinträchtigt wird [Abbildung 18].

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte Davis et al. in einer früheren Studie mit gesunden, männlichen Probanden mittels Laser-Doppler Messung vor und nach ACh-Iontophorese keinen Effekt der akuten Hhcy auf die mikrovaskuläre Funktion zeigen [153]. Die Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten in der geringeren Stromstärke für die Iontophorese oder in der Auswahl der untersuchten Probanden liegen. So verwendete Davis et al. während der Iontophorese mit Azetylcholin bzw. Natrium-Nitroprussid Stromstärken von 8, 16, 32, 64 und 128  $\mu\text{A}$  für jeweils 10 sec. Demgegenüber begannen wir in unserem Protokoll stets mit 0,1 mA für 10 sec., danach folgten 0,2 mA für 10 sec. und 20 sec. Außerdem arbeitete Davis et al. nur mit gesunden Männern, während in der vorliegenden Studie das Geschlechtsverhältnis ausgeglichen war. Jedoch konnten wir keine geschlechtsbedingten Unterschiede bei unseren Ergebnissen feststellen. Das Alter der Probanden beider Studien war vergleichbar.

Eine Erhöhung des Blutdrucks im Rahmen der akuten Hyperhomocysteinämie konnten wir im Gegensatz zu Davis et al. nicht feststellen [Tabelle 2]. Da Davis et al. nur die mikrovaskuläre endotheliale Funktion untersuchte, bleibt darüber hinaus unklar, inwieweit überhaupt eine makrovaskuläre endotheliale Dysfunktion ausgelöst wurde.

In unserer Untersuchung zeigte sich ein interindividueller Variationskoeffizient der ACh-Iontophorese von rund 30%, was auf eine eingeschränkte Reliabilität der Laser-Doppler-Messungen hinweist.



Die Ursache dieser Schwankungsbreite der Laser-Doppler-Messungen ist vor allem in einer beträchtlichen zeitlichen und örtlichen Variabilität des Laser-Doppler-Signals zu suchen. Etwas geringere interindividuelle Variationskoeffizienten von Laser-Doppler-Messungen von 16-21% wurden in anderen Studien beschrieben [150, 175]. Welche genauen Mechanismen sich hinter der Wirkung einer Hcy auf die mikrovaskuläre, endotheliale Funktion verbergen, wurde von uns nicht untersucht. Es ist bekannt, dass die ACh-induzierte, endothelabhängige Vasodilatation in den großen Gefäßen fast ausschließlich durch die lokale Freisetzung von NO vermittelt wird. Demgegenüber geht man davon aus, dass in mikrovaskulären Gefäßen alternative Signalwege vorherrschen und die ACh-induzierte Vasodilatation vermutlich durch freigesetztes EDHF vermittelt wird [148]. Ob die akute Hhcy beim Menschen die Freisetzung oder Funktion von EDHF beeinträchtigt, ist unbekannt. In früheren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die EDHF-abhängige Vasodilatation in der renalen Mikrozirkulation von Ratten durch eine Methionin-induzierte Hhcy beeinträchtigt wird [149].

### 4. 3. 2. Kapillarmikroskopie

Die physiologische Fähigkeit der mikrovaskulären Strombahn auf definierte Stimuli, wie einer Flusszunahme nach suprasystolischer Stauung, zusätzliche Kapillaren für die Perfusion bereitzustellen, wird als kapilläres Recruitment bezeichnet. Sie wird von der endothelialen Funktion beeinflusst. Die Beeinträchtigung des kapillären Recruitments kann als Hinweis auf eine verminderte mikrovaskuläre, endotheliale Funktion gedeutet werden [139]. In unseren Untersuchungen ließ sich während akuter Hyperhomocysteinämie nach Methioninbelastung nur ein Trend hin zu einer Beeinträchtigung des kapillären Recruitment nachweisen. Dieser Trend ist auf dem Hintergrund eines doch erheblichen interindividuellen Variationskoeffizienten von 52 % zu interpretieren. Um angesichts dieser methodisch bedingten Schwankungsbreite der Messergebnisse verlässliche Aussagen über Veränderungen des kapillären Recruitments infolge einer akuten Hyperhomocysteinämie treffen zu können, wäre für unsere Untersuchungen eine deutlich größere Fallzahl notwendig gewesen. In der Literatur wurde die Methode bislang von einer Gruppe zum Nachweis einer mikrovaskulären, endothelialen Dysfunktion sowohl bei Hypertonikern [173] als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus [176] eingesetzt.

Der von dieser Arbeitsgruppe berichtete interindividuelle Variationkoeffizient von 8,3 % kontrastiert dabei erheblich mit unseren Beobachtungen und lässt bei vergleichbar standardisierten Untersuchungsbedingungen methodische Fragen der kapillarmikroskopischen Messung des kapillären Recruitments offen.

### 4. 4. Effekte der AGE-Behandlung auf die endotheliale Funktion bei akuter Hyperhomocysteinämie

Während nach Plazebo-Behandlung weiterhin auf beiden vaskulären Ebenen eine endotheliale Dysfunktion bestand, ließ sich diese nach 6-wöchiger Vorbehandlung mit AGE sowohl auf makro-, als auch auf mikrovaskulärer Ebene nicht mehr nachweisen. So zeigte die endothelabhängige Vasodilatation der A. brachialis und die ACh-induzierte Zunahme der Hautperfusion bei mit AGE behandelten Probanden vor und nach oraler Methioninbelastung im Gegensatz zu den Messungen vor AGE-Behandlung keinen signifikanten Unterschied mehr auf ( $p > 0.05$ ).

Demgegenüber konnten wir in der mit Plazebo behandelten Gruppe unverändert eine klare endotheliale Dysfunktion vor und nach oraler Methioninbelastung auf mikro- und makrovaskulärer Ebene nachweisen ( $p < 0.05$ ). Die endothelunabhängige Vasodilatation blieb durch die Vorbehandlung mit AGE bzw. Plazebo in beiden vaskulären Feldern unbeeinflusst. Bezüglich der Mikrovaskularisation konnten wir somit erstmals beim Menschen zeigen, dass eine durch Methioninbelastung induzierte ED sich unter Vorbehandlung mit AGE verhindern lässt. Ein möglicher Mechanismus der AGE-Behandlung besteht darin, dass wasserlösliche Cysteinyilverbindungen wie AGE, vermutlich über eine Steigerung von intrazellulären Thiol-Antioxidantien, zumindest teilweise die Verringerung in der Bioverfügbarkeit von NO bzw. EDHF während akuter Hhcy verhindern kann [120]. Somit unterstreichen unsere Ergebnisse auch die Bedeutung der zellulären Redoxbalance für die endotheliale Funktion. Die Effekte von AGE auf die endotheliale Funktion könnten unter anderem dazu beitragen, die Progression koronarer Verkalkungen zu verringern, wie dies kürzlich an Koronarpatienten unter AGE-Behandlung beobachtet wurde [155].

#### 4. 5. Limitationen der Studie

Unsere Studie weist einige Limitationen auf:

1. Die Fallzahl in unserer Studie war mit 11 Probanden relativ gering.
2. Die Gabe von Methionin erfolgte nicht verblindet. Die Untersuchungen vor und nach Methioninbelastung erfolgten en Bloc, so dass dem Untersucher bekannt war, ob ein Proband Methionin eingenommen hatte oder nicht. Dies könnte ggf. zu einem Bias im Bezug auf die Interpretation der diesbezüglichen Messwerte geführt haben.
3. Die vaskulären Funktionen unterliegen physiologischerweise einer zirkadianen Rhythmik [179]. Wir führten unsere Untersuchung so aus, dass wir regelhaft die Probanden vor Methioninbelastung vormittags und nach Methioninbelastung nachmittags untersuchten. Inwieweit hier ein zirkadianer Effekt einfließt, bleibt unklar. Kürzliche Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmik vaskulärer Funktionsmessungen zeigten zumindest im Hinblick auf die FMD keine relevanten Effekte [154].

Jedoch wurde in einer Studie der Universität Hannover demonstriert, dass bei Gesunden und Patienten mit einer AVK im Stadium II am frühen Nachmittag und stärker ausgeprägt in der Nacht ein signifikanter Anstieg des Laser-Doppler-Flusses des Fußes ( $P < 0,001$ ) besteht [179]. Im Stadium IV war der Anstieg deutlich, bei Diabetikern nochmals zusätzlich vermindert. Die Hautperfusion scheint dabei von der Thermoregulation abgekoppelt zu sein, vermutlich infolge einer lokal bedingten kontinuierlichen arteriölen Vasodilatation.

4. Nach oraler Methioninbelastung kam es zu einer milden, jedoch signifikanten Steigerung der Triglycerid- bzw. Senkung der HDL-Cholesterinkonzentration [Tabelle 2]. Es scheint unwahrscheinlich, dass diese Veränderungen unsere Ergebnisse relevant beeinflusst haben. Zwar führt eine postprandiale Hyperlipidämie bei hyperlipidämischen Patienten zu einer makrovaskulären endothelialen Dysfunktion, jedoch resultiert eine milde oder akute Hypertriglyceridämie nicht in einer ED bei normolipidämischen Probanden [151]. Außerdem verursacht eine postprandiale Hyperlipidämie von dem Ausmaß, wie wir sie bei unseren Probanden gefunden haben oder höher keine endotheliale Dysfunktion in Widerstandsgefäßen des Unterarms [152].

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Hier sind zuerst **Prof. Dr. med. U. Hoffmann**, Leiter der Angiologie der medizinischen Poliklinik Innenstadt (LMU) und mein Mitbetreuer **Dr. med. Thomas Abahji** zu erwähnen, die mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift unterstützten und mir in allen fachlichen Fragen stets zur Seite standen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Norbert Weiss, Ide Nagatoshi, Pirrko Kölle und Christiane Keller bedanken. Zum Schluss vielen Dank an alle freiwilligen Probanden, ohne die diese Forschungsarbeit nicht hätte stattfinden können.

Diese Arbeit wurde durch Fördermittel der Firma Wakunaga of America, Co. Ltd, Mission Viejo, CA, USA und des Friedrich-Baur-Instituts, München, Deutschland, unterstützt.

5. Literaturverzeichnis:

**1 Worthley SG, Osende JI, Helft G et al.** Coronary artery disease: pathogenesis and acute coronary syndromes. Mt Sinai J Med 2001;68:167-81.

**2 Cooke JP, Stamler J, Andon N et al.** Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. Am J Physiol 1990; 259:H804-12.

**3 Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS et al.** Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. J Pharmacol Exp Ther 1986; 237:893-900.

**4 Napoli C, Ignarro LJ.** Nitric oxide and atherosclerosis. Nitric Oxide 2001; 5: 88-97.

**5 Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 288: 373-376.

**6 Verma S, Buchanan M, Anderson TJ.** Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. 2003; 108: 2054-2059.

**7 Behrendt D, Ganz P.** Endothelial functions: from vascular biology to clinical applications. Am J Cardiol. 2002; 90:40L-48L.

**8 Michel T, Feron O.** Nitric oxide synthase: which, where, how and why? J Clin Invest. 1997;100:2146-2152.

**9 Mato JM, Avila MA, Corrales FJ.** Biosynthesis of S-adenosylmethionine. In: Carmel R, Jacobsen DW, editors. Homocysteine in health and disease. Cambridge: Cambridge University Press, 2001:47-62.

- 10 Mansoor MA, Svardal AM, Schneede J, Ueland PM.** Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men. *Clin Chem* 1992;38:1316-21.
- 11 Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H.** Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading. *Clin Chem* 1993;39:1390-7.
- 12 Mansoor MA, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Refsum H, Ueland PM, Svardal AM.** Redox status and protein binding of plasma aminothiols during the transient hyperhomocysteinemia that follows homocysteine administration. *Clin Chem* 1993;39:980-5.
- 13 Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, Keller C, Keaney JF Jr., Loscalzo J.** Influence of Hyperhomocysteinemia on the Cellular Redox State- Impact on Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(11):1455-1461.
- 14 Weiss N, Hilge R, Hoffmann U.** Mild hyperhomocysteinemia: risk factor or just risk predictor for cardiovascular diseases? *Vasa* 2004;33:191-203.
- 15 Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS et al.** A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274:1049-57.
- 16 Graham IM, Daly LE, Refsum HM et al.** Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277:1775-81.
- 17 A'Brook R, Tavendale R, Tunstall-Pedoe H.** Homocysteine and coronary risk in the general population: analysis from the Scottish Heart Health Study and Scottish MONICA surveys. *Eur Heart J* 1998;19 (Suppl):8 (Abstr).

- 18 Arnesen E, Refsum H, Bonaa KH et al.** Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995 ;24:704-9.
- 19 Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH et al.** Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Arch Intern Med* 1999;159:1077-80.
- 20 Bots ML, Launer LJ, Lindemans J et al.** Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly : the Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999;159:38-44.
- 21 Kark JD, Selhub J, Adler B et al.** Nonfasting plasma total homocysteine level and mortality in the middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Ann Intern Med* 1999;131:321-30.
- 22 Moustapha A, Naso A, Nahlawi M et al.** Prospective Study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. *Circulation* 1998;97:138-41.
- 23 Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H et al.** Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1997;37:230-6.
- 24 Perry IJ, Refsum H, Morris RW et al.** Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 1995;346:1395-8.
- 25 Petri M, Roubenoff R, Dallal GE et al.** Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1996; 348:1120-4.
- 26 Ridker PM, Manson JE, Buring JE et al.** Homocysteine and risk of Cardiovascular disease among postmenopausal women. *JAMA* 1999;281:1817-21.
- 27 Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC et al.** A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992;268:877-81.

- 28 Wald NJ, Watt HC, Law MR et al.** Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 1998;158:862-7.
- 29 Whincup PH, Refsum H, Perry IJ et al.** Serum total homocysteine and coronary Heart disease: prospective study in middle-aged men. *Heart* 1999;82:448-54.
- 30 Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor LM jr (1994).** Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. *Clin Chem* 40:873–881
- 31 Kang S-S, Wong PWK, Malinow MR (1992).** Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr* 12:279–298
- 32 McCully KS (1969).** Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56:111–128
- 33 Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, Tracy T, Sieve-Smith L, Wang Y (1995).** Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Card* 75:132–136
- 34 Mølgaard J, Malinow MR, Lassvik C, Holm AC, Upson B, Olsson AG (1992).** Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication. *J Intern Med* 231:273–279
- 35 Den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GMJ, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendahl F (1996).** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 334:759–762.



- 36 Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH (1997).** Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1947–1953
- 37 Omenn GS, Beresford SAA, Motulsky AG (1998).** Preventing coronary heart disease: B vitamins and homocysteine. *Circulation* 97:421–424
- 38 Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GHJ, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Grobe H, Schmidt H, Schweitzer L (1985)** The natural history of hyperhomocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:1–31
- 39 Boers GHJ, Smals AGH, Trijbels FJM, Fowler B, Bakkeren JA, Schoonderwaldt HC, Kleijer WJ, Kloppenborg PW (1985).** Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 313:709–715
- 40 McCully KS (1996).** Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 2:386–389
- 41 Bachmann J, Tepel M, Raidt H, Riezler R, Graefe U, Langer K, Zidek W (1995).** Hyperhomocysteinemia and the risk for vascular disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 6:121–125
- 42 Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K (1996).** Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 27:517–527
- 43 Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM (1991).** Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. *Cancer Res* 51:828–835

- 44 Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJH (1996).** The effect of a subnormal vitamin B6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 98:177–184
- 45 Vermaak WJ, Ubbink JB, Barnard HC, Potgieter GM, van Jaarsveld H, Groenewald AJ (1990).** Vitamin B6 nutrition status and cigarette smoking. *Am J Clin Nutr* 51:1058–1061
- 46 Sydow K, Böger R. H.** Homocyst(e)in, endotheliale Dysfunktion und kardiovaskuläres Risiko. Pathomechanismen und therapeutische Optionen (2001). *Z Kardiol* 90:1–11.
- 47 Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M et al.** Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106:9-19.
- 48 Folsom AR, Nieto FJ, McGovern PG et al.** Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphisms and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 1998;98:204-10.
- 49 Kuller LH, Evans RW.** Homocysteine, vitamins and cardiovascular disease. *Circulation* 1998;98:196-9.
- 50 Ubbink JB, Fehily AM, Pickering J et al.** Homocysteine and ischaemic heart disease in Caerphilly cohort. *Atherosclerosis* 1998;140:349-56.
- 51 Verhoev P, Hennekens CH, Malinow MR et al.** A prospective study of plasma homocysteine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:1924-30.
- 52 Vane JR, Anggard EE, Botting RM.** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.

- 53 Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J.** Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2000;15:409-15.
- 54 Weiss N, Keller C, Hoffmann U et al.** Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2002;7:227-39.
- 55 Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL et al.** Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046-51.
- 56 Kinlay S, Libby P, Ganz P.** Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:383-389.
- 57 Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A et al.** Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 2000;106:483-91.
- 58 Holven KB, Holm T, Aukrust P et al.** Effect of folic acid treatment on endothelium-dependent vasodilation and nitric oxide-derived end products in hyperhomocysteinemic subjects. *Am J Med* 2001;110:536-42.
- 59 Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ et al.** Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-7.
- 60 Weiss N, Zhang YY, Heydrick S et al.** Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12503-8.
- 61 Zhang X, Li H, Jin H et al.** Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F671-8.

- 62 Li N, Yi FX, Rute E et al.** Effects of homocysteine on intracellular nitric oxide and superoxide levels in the renal arterial endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1237-43.
- 63 Baron DA, Lofton CE, Newman WH, Currie MG.** Atriopeptin inhibition of thrombin-mediated changes in the morphology and permeability of endothelial monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3394–8.
- 64 Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A, van Hindsberg VWM.** CGMP and nitric oxide modulate thrombin induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76:199–208.
- 65 Kohn S, Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM.** Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 1992; 67: 596–607.
- 66 Westendorp RGJ, Draijer R, Meinders AE, van Hindsberg VWM.** CGMP mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *Circ Res* 1994; 31: 42–51.
- 67 Majno G, Palade GE.** Studies on inflammation: The effect of histamine and serotonin on vascular permeability. An electron microscope study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 11: 571–605.
- 68 Lentz SR, Sadler JE (1993).** Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* 81:683–689
- 69 Hajjar KA (1993).** Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 91:2873–2879

- 70 Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K (1993).** Homocyst(e)ine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 92:1381–1386
- 71 Rodgers GM, Kane WH (1986).** Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular cell activator. *J Clin Invest* 77:1909–1916
- 72 Lentz SR, Sadler JE (1991).** Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein-C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* 88:1906–1914
- 73 Loscalzo J (1996).** The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 98:5–7
- 74 Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J (1992).** Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin.
- 75 Lang D, Kredan MB, Moat SJ et al.** Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:422-7.
- 76 Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-6.
- 77 Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM et al.** Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995;77:510-8.
- 78 Guerra, R., Jr., Brotherton, A. F., Goodwin, P. J., Clark, C. R., Armstrong, M. L. & Harrison, D. G. (1989).** Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis: implications of altered autocrine and paracrine functions of EDRF. *Blood Vessels* 26:300-314.

- 79 Luscher, T. F., Richard, V., Tschudi, M. Yang, Z. H. & Boulanger, C. (1990).** Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *J. Am. Coll. Cardiol.* 15:519-527.
- 80 Wilcken, D. E., Wng, X. L., Adachi, T., Hara, H., Duarte, N., Green, K. & Wilcken, B. (2000).** Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in Homocysteinuria: possible relevance to cardiovascular risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* 20:1199-1202.
- 81 Yamamoto, M., Hara, H. & Adachi, T. (2000).** Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett.* 486:159-162.
- 82 Weiss N, Zhang Y & Loscalzo J (2000).** Homocysteine impairs cellular glutathione peroxidase expression and promotes endothelial dysfunction in an animal model of hyperhomocysteinemia. *Circulation* 102:II-238 (Abstr).
- 83 Weiss N, Heydrick S, Zhang YY, Bierl C, Cap A & Loscalzo J (2002).** Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathione beta-synthase-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22:34-41.
- 84 Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J.** Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc. Med* 2002;7:227-39.
- 85 Zhang F, Slungaard A, vercellotti GM, Iadecola C.** Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am J Physiol* 1998;274:R1704-11.
- 86 Mujumdar VS, Aru GM, Tyagi SC.** Induction of oxidative stress by hyperhomocysteinemia impairs endothelial function. *J Cell Biochem* 2001;82:491-500.
- 87 Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR et al.** L-Homocysteine and L-Homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2004;36:623-40.

- 88 Chern CL, Huang RF, Chen YH et al.** Folate deficiency-induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF-kappaB in human Hep G2 cells. *Biomed Pharmacother* 2001; 55:434-42.
- 89 Toborek M, Henning B.** Dietary methionine imbalance, endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Nutr Res* 1996;16:1251-66.
- 90 Chambers JC, McGregor A, Jean-Marie J et al.** Demonstration of rapid onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation* 1999;99:1156-60.
- 91 Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL et al.** Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation* 1999;100:1161-8.
- 92 Nappo F, De Rosa N, Marfella R et al.** Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA* 1999;281:2113-8.
- 93 Raghuveer G, Sinkey CA, Chenard C et al.** Effect of vitamin E on resistance vessel endothelial dysfunction induced by methionine. *Am J Cardiol* 2001;88:285-90.
- 94 Vallance P, Leone A, Calver A et al.** Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:60-2.
- 95 Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K et al.** Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocysteinemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1557-64.

- 96 Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM et al.** Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocysteinemia in humans. Clin Sci (Lond) 2001;100:161-7.
- 97 Holven KB, Haugstad TS, Holm T et al.** Folic acid treatment reduces plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinemic subjects. Br J Nutr 2003;89:359-63.
- 98 Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE et al.** Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation 2003;108:933-8. Epub 2003 Aug 11.
- 99 Wanby P, Brattstrom L, Brudin L et al.** Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. Scand J Clin Lab Invest 2003;63:347-53.
- 100 Topal G, Brunet A, Millanvoye E et al.** Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of no-synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. Free Radic Biol Med 2004;36:1532-41.
- 101 Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM (2000).** LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human endothelial cells. Involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Circ Res 87:99–105.
- 102 Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C et al.** Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;282:H1255-61.
- 103 Postea O, Kroetz F, Hillebrand S, Banas B, Zahler S, Keller C, Weiss N.** Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine. J Inherit Metab Dis 2003;26(S1):20 (Abstr.)



- 104 Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, cHeistad DD (1996).** Vascular dysfunction in monkeys with diet induced Hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 98:24–29.
- 105 Celermajer DS, Sorensen KE, Ryallis M, Robinson J, Thomas O, Leonard JV, Deanfield JE (1993).** Impaired endothelial function occurs in the systemic arteries of children with homozygous homocystinuria but not in their heterozygous parents. *J Am Coll Cardiol* 22:854–858.
- 106 Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA (1997).** Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 95:1119–1121.
- 107 Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung ASP, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS (1997).** Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 96:2542–2544.
- 108 Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC, Townsend JN.** Does folic acid decrease plasma homocysteine and improve endothelial function in patients with predialysis renal failure? *Circulation* 2000;102:871-5.
- 109 Vita JA, Frei B, Holbrook M, Gokce N, Leaf C, Keaney JF, JR.** L-2-Oxothiazolidine-4carboxylic acid reverses endothelial dysfunction in patients with coronary heart disease. *J. Clin Invest* 1998;101:1208-14.
- 110 Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W.** The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2003;107:992-5.

- 111 Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y.** Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 2001;131:955S-62S.
- 112 Imaji J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, Itakura Y.** Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 1994;60:417-20.
- 113 Ide N, Lau BH.** S-allylcysteine attenuates oxidant stress in endothelial cells. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25(5):619-24.
- 114 Dillon SA, Lowe GM, Billington D, Rahman K.** Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F (2alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *J Nutr* 2002;132:168-71.
- 115 Genz Z, Lau BHS.** Aged garlic extract modulates glutathione redox cycle and superoxide dismutase activity in vascular endothelial cells. *Phytother Res* 1997;11:54-6.
- 116 Wei Z, Lau BHS.** Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 1998;18:61-70.
- 117 Ide N, Nelson AB, Lau BH.** Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu(2+)-induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Med* 1997;63:263-4.
- 118 Lau BH.** Suppression of LDL oxidation by garlic. *J Nutr* 2001;131(3s):985S-8S.
- 119 Ide N, Lau BH.** Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. *J Nutr* 2001;131:1020S-6S.
- 120 Morihara N, Sumioka I, Moriguchi T, Uda N, Kyo E.** Aged garlic extract enhances production of nitric oxide. *Life Sci* 2002;71:509-17.

- 121 Rahman K, Billington D.** Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *J Nutr* 2000;130:2662-5.
- 122 Steiner M, Lin RS.** Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:904-8.
- 123 Efendy JL, Simmons DL, Campbell JH.** The effect of aged garlic extract, “Kyolic”, on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1997;132:37-42.
- 124 Kim KM, Chun SB, Koo MS, Choi WJ, Kim TW, Kwon YG, Chung HT, Billiar TR, Kim YM.** Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by garlic component S-allylcysteine. *Free Radic Biol Med* 2001;30:747-756.
- 125 Schachinger V, Britten B, Zeiher AM (2000).** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101, 1899-1906.
- 126 Heitzer T, Schlinzig T, Münzel T (2001).** Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk factors of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104, 2673-2678.
- 127 Rösen P, Hellige G (2001).** Diabetes und Hypertonie-eine kardiovaskuläre Risikokonstellation. In: Aventis Pharma Deutschland GmbH (Hrsg.): Herz-Kreislauf Transparent (erste Auflage). Verlag H. Hoffmann GmbH, Berlin, S. 5-35
- 128 Rütten H, Scheidler S, Heitsch H (2001).** Endotheliale Dysfunktion: Vom Marker zu Medikamenten ? *Nachr. Chem.* 49, 1411 -1415
- 129 Miller RC, Pelton JP, Huggins JP.** Endothelins: from receptors to medicine. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 54–60.

- 130 Weiss N, Feussner A, Hailer S, Spengel FA, Keller C, Wolfram G.** Influence of folic acid, pyridoxal phosphate and cobalamin on plasma homocysteine levels and the susceptibility of low-density lipoprotein to ex-vivo oxidation. *Eur J Med Res* 1999;4:425-32.
- 131 Hansen TN, Dawson PE, Brockbank KG.** Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance. *Cryobiology* 1994; 31: 101–6.
- 132 Herrera B, Eisenberg G, Holberndt O, Desco MM, Rabano A, Garcia-Barreno P, Del Canizo JF.** Paradoxical effects of temperature on vascular tone. *Cryobiology* 2000; 41: 43–50.
- 133 Quinlan PT, Lane J, Moore KL, Aspen J, Rycroft JA, O’Brien DC.** The acute physiological and mood effects of tea and coffee: the role of caffeine level. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 19–28.
- 134 Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M.** Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 2002;105:1155-1157.
- 135 Takasu J, Uykim pang R, Sunga MA, Amagase H, Niihara Y.** Aged garlic therapy for sickle cell anemia patients. *BCM Blood Disorders* 2002;2:3 (Abstr.).
- 136 Budhoff MJ, Takasu J, Flores F, Niihara Y, Lu B, Lau BH et al.** Anti-atherosclerotic effect of aged garlic extract (Kyolic) in bypass surgery patients analyzed by computed tomography. *FASEB J* 2003;17:A83047 (Abstr.).
- 137 Ijzerman RG, de Jongh RT, Beijl MA, van Weissenbruch MM, Delmarre-van de Waal HA, Serne EH et al.** Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired mikrovaskular function in skin. *Eur J Clin Invest* 2003;33:536-42.

- 138 Nilsson GE, Tenland T, Oberg PA.** Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *IEEE Trans Biomed Eng* 1980;27:597-42.
- 139 Serne EH, Gans RO, ter Maaten JC, Tangelder GJ, Donker AJ, Stehouwer CD.** Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension* 2001;38:238-42.
- 140 Franzeck UK, Stengele B, Panradl U, Wahl P, Tillmanns H.** Cutaneous reactive hyperemia in short-term and long-term type I diabetes—continuous monitoring by a combined laser Doppler and transcutaneous oxygen probe. *Vasa* 1990;19:8-15.
- 141 Seifert H, Jager K, Bollinger A.** Analysis of flow motion by the laser Doppler technique in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988;7:223-36.
- 142 Anderson TJ, Elstein E, Haber H et al.** Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (Banff study). *J Am Cardiol* 2000;35:60-66.
- 143 Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al.** Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-265.
- 144 Weiss N.** Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* 2005;6:27-36.
- 145 Dayal S, Lentz SR.** ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2005;10 Suppl 1:S27-33.
- 146 Bertsch T, Mielke O, Holy S, Zimmer W, Casarin W, Aufenanger J, et al.** Homocysteine in cerebrovascular disease: an independent risk factor for subcortical vascular encephalopathy. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:721-724.

- 147 Looker HC, Fagot-Campagna A, Gunter EW, Pfeiffer CM, Narayan KM, Knowler WC, et al.** Homocysteine as a risk factor for nephropathy and retinopathy in Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2003;46:766-772.
- 148 Triggle CR, Ding H, Anderson TJ, Pannirselvam M.** The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. *Mol Cell Biochem* 2004;263:21-27.
- 149 De Vriese AS, Blom HJ, Heil SG, Mortier S, Kluijtmans LA, Van de Voorde J, et al.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated renal vasodilatory response is impaired during acute and chronic hyperhomocysteinemia. *Circulation* 2004;109:2331-2336.
- 150 Farkas K, Kolossvary E, Jarai Z, Nemcsik J, Farsang C.** Non-invasive assessment of microvascular endothelial function by laser Doppler flowmetry in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis* 2004;173:97-102.
- 151 Giannattasio C, Zoppo A, Gentile G, Failla M, Capra A, Maggi FM, et al.** Acute effect of high-fat meal on endothelial function in moderately dyslipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:406-410.
- 152 Gudmundsson GS, Sinkey CA, Chenard CA, Stumbo PJ, Haynes WG.** Resistance vessel endothelial function in healthy humans during transient postprandial hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 2000;85:381-385.
- 153 Davis KR, Pearson H, Moat S, Bonham JR, Donnelly R.** Acute hyperhomocysteinaemia affects pulse pressure but not microvascular vasodilator function. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:327-332.

- 154 ter Avest E, Holewijn S, Stalenhoef AF, de Graaf J.** Variation in non-invasive measurements of vascular function in healthy volunteers during daytime. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:425-431.
- 155 Budoff, M. J., Takasu, J., Flores, F. R., Niihara, Y., Lu, B., Lau, B. H., Rosen, R. T. & Amagase, H. (2004)** Inhibiting progression of coronary calcification using Aged Garlic Extract in patients receiving statin therapy: a preliminary study. *Prev. Med.* 39: 985-991.
- 156 Arora, S., Smakowski, P., Frykberg, R. G., Simeone, L. R., Freeman, R., LoGerfo, F. W. & Veves, A. (1998)** Differences in foot and forearm skin microcirculation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care.* 21: 1339-1344.
- 157 Veves, A., Akbari, C. M., Primavera, J., Donaghue, V. M., Zacharoulis, D., Chrzan, J. S., DeGirolami, U., LoGerfo, F. W. & Freeman, R. (1998)** Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxide synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease, and foot ulceration. *Diabetes* 47: 457-463.
- 158 Robinson K, Arheart K, Refsum H, Brattström L, Boers G, Ueland P, Rubba P, Palma-Reis R, Meleady R, Daly L, Wittenman J, Graham I (1998)** Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 97:437–443.
- 159 Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH (1993)** Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270:2693–2698.
- 160 Homocysteine Lowering Trialist's Collaboration (1998)** Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials. *Brit Med J* 316:894–898.

- 161 Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, Allen RH, Lindenbaum J (1995)** Effects of vitamin B12, folate, and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 346:85–89.
- 162 Clarke R, Armitage J.** Vitamin supplements and cardiovascular risk. Review of the randomized trials of homocysteine-lowering vitamin supplements. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26:341-8.
- 163 Peterson JC, Spence JD.** Vitamins and progression of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *Lancet* 1998;351:263.
- 164 Chao CL, Cien KL, Lee YT.** Effect of short-term vitamin (folic acid, vitamins B6 and B12) administration on endothelial dysfunction induced by post-methionine load hyperhomocysteinemia. *Am Cardiol* 1999;84:1359-61.
- 165 Assanelli D, Bonanome A, Pezzini A et al.** Folic acid and vitamin E supplementation effects on homocysteinemia, endothelial function and plasma antioxidant capacity in young myocardial-infarction patients *Pharmacol Res* 2004;49:79-84.
- 166 The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators (2000)** Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 342:154–160
- 167 Pascoal, I.F. and J.U.Umans. 1996.** Effects of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels. *Hypertension (Dallas)*. 28:183-187.
- 168 Wallerstedt, S.M. and M. Bodelsson. 1997.** Endothelium-dependent relaxation by substance P human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br. J. Pharmacol.* 120:25-30.



- 169 Lemmy Urakami-Harasawa, Hiroaki Shimokawa et al. 1997.** Importance of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Human Arteries. *J. Clin. Invest.* 11:2793-2799.
- 170 An S. De Vriese, Henk J. Blom, Sandra G. Heil et al. 2004.** Endothelium- Derived Hyperpolarizing Factor – Mediated Renal Vasodilatory Response is impaired during acute and chronic hyperhomocysteinemia. *Circulation*, 109:2331-2336].
- 171 Chris R Triggie and Hong Ding 2002.** Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Is There A Novel Chemical Mediator? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29:153-160.
- 172 Michel Félétou, Paul M. Vanhoutte.** Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Where are we now? *Arteriosler Thromb Biol* 2006;26:1215-1225.
- 173 Erik H. Serné et al.** Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension* 2001;38:238-242.
- 174 S J Morris and A C Shore.** Skin blood flow responses to the iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside in man: possible mechanisms. *The Journal of Physiology* 1996; 496: 531-542.
- 175 Kubli S, Beranrd W, Dalle-Ave A, Feihl F.** Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 640–648.
- 176 Eduardo Tibirica, Elba Rodrigues, Roberta Cobas, and Marilia B. Gomes.** Impairment of Skin Capillary Recruitment Precedes Chronic Complications in Patients with Type 1 Diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2007 Summer; 4(2): 85–88.

- 177 Mizuno Ikuko et al.** Prevention of Methionine-induced Hyperhomocysteinemia in Rats by Aged Garlic Extract Preparation Combined with Pyridoxine Hydrochloride, Nicotinamide, Pantenol and Liver Extract. *Pharmacometrics* 2006; 71: 61-66.
- 178 Yeh YY., Yeh SM., Lim HS., Picciano MF.** Garlic Extract reduces plasma concentration of homocysteine in rats rendered folic acid deficient. *The FASEB Journal* 1999, 13: abs. #209.12.
- 179 L. Caspary, S. Nordbruch, R. Lange and A. Creutzig.** Circadian variation of skin perfusion in arterial occlusive disease. *VASA*, Band 26, 1997, Heft 3, Seite 194 – 198.

# Curriculum vitae

---

## ANGABEN ZUR PERSON

Name: Lars Nill  
Geburtsdatum: 14. Dezember 1979  
Geburtsort: Böblingen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## AUSBILDUNG

2000-2006 Vorklinische und klinische Ausbildung an der  
„Ludwig-Maximilians-Universität“ München:  
  
2006 3. Staatsexamen  
2005/2006 Praktisches Jahr  
2005 2. Staatsexamen  
2003 1. Staatsexamen  
2002 Physikum  
1999 Abitur  
1990-99 „Burg-Gymnasium“ Schorndorf, Baden-Württemberg  
1986-90 Grundschule Miedelsbach, Baden-Württemberg

## BUNDESWEHR

1999/2000 Sanitätsdienst in Horb und Dillingen a. D.

## VERÖFFENTLICHUNGEN/POSTER

- 2006 **Akute Hyperhomocysteinämie nach oraler Methioninbelastung führt zur makro- und mikrovaskulären endothelialen Dysfunktion.**  
Abahji T., Nill L., Ide N., Kölle P., Keller C., Hoffmann U., Weiss N.  
Poster-Preis der DGIM (Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin) in Wiesbaden
- 2006 Weiss N, Nagatoshi I, Abahji T, Nill L, Keller C, Hoffmann U.  
**Aged Garlic Extract Improves Homocystein-Induced Endothelial Dysfunction in Macro- and Microcirculation.** American Society for Nutrition, J. Nutr. 136:750S-754S
- 2007 ABAHJI Thomas; NILL Lars; IDE Nagatoshi; KELLER Christiane; HOFFMANN Ulrich; WEISS Norbert;  
**Acute hyperhomocysteinemia induces microvascular and macrovascular endothelial dysfunction.** Archives of medical research (ARCMED-D-06-00327), published by Elsevier, Amsterdam; vol. 38(4): 411-6.